



Maria Alexandra Marques Martins Campos

Mestre

Caracterização de propriedades nutricionais e antioxidantes de chás do Arquipélago dos Açores e valorização dos seus resíduos

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Qualidade Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves,
Profª Auxiliar, FCT/UNL

Co-Orientadora: Professora Doutora Benilde Simões Mendes, Profª Associada
com Agregação, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Profª. Doutora Maria Rosa Santos de Paiva

Arguentes: Prof. Doutor Fernando Jorge Ramos

Profª. Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira

Vogais: Prof. Doutora Olívia Maria de Castro Pinho

Prof. Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira

Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues

Profª. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves

Profª. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Dezembro 2014

Direitos de cópia

Caracterização de propriedades nutricionais e antioxidantes de chás do Arquipélago dos Açores e valorização dos seus resíduos, Copyright de Maria Alexandra Marques Martins Campos, FCT-UNL; UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Epígrafe

“O bem comum da humanidade inteira não é a simples soma do bem comum das nações; seria mais exacto considerá-lo como o conjunto de condições mediante as quais cada nação pode alcançar a sua prosperidade.”

Paulo VI *in Populorum Progressio*

Dedicatória

Dedico este trabalho de investigação ao meu marido Fernando Campos, à minha Família e à memória do Professor José Filipe dos Santos Oliveira.

Agradecimentos

- Ao saudoso Professor José Filipe dos Santos Oliveira, pelo incentivo para iniciar este empreendimento.
- À minha Orientadora, Professora Doutora Margarida Gonçalves, que sabiamente me orientou a prosseguir e a terminar a elaboração desta Tese.
- À minha Co-orientadora, Professora Doutora Benilde Mendes, pelo incentivo e apoio na elaboração desta Tese.
- Ao Professor Doutor Manuel José Damásio, por me dispensar tempo do serviço, para a realização do Doutoramento.
- Ao Professor Doutor José Rogado, pelo apoio à realização do Doutoramento.
- Ao meu marido, Fernando Campos, pela ajuda e apoio incondicional, para a realização deste trabalho.
- A todas as outras pessoas que, directa ou indirectamente deram o seu apoio e colaboração,

Muito Obrigada!

Resumo

Neste trabalho estudou-se a composição e actividade antioxidante de chás verdes e pretos (8 provenientes dos Açores, e 11 de outras origens), 4 chás vermelhos e 6 tisanas de ervas.

A composição mineral das folhas de chá e das correspondentes infusões de 5 e 15 minutos foi avaliada no que se refere aos macroelementos (K, Ca, Mg e Na) com valor nutricional e ao alumínio (Al), tendo-se verificado que as suas concentrações dependem do tipo de chá e do tempo de infusão.

A actividade antioxidante dos chás e tisanas foi avaliada pela reacção de Folin-Ciocalteu, a actividade antiradicalar (DPPH) e actividade redutora férrica (FRAP). Estas actividades aumentaram ou diminuíram com o tempo de infusão e dependendo do tipo de chá e do teste específico o que indica diferentes cinéticas de extracção e degradação de compostos específicos.

Os compostos fenólicos dos chás foram quantificados por HPLC-DAD e agrupados nas famílias de catequinas, metilxantinas, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, teoflavinas, flavonas, flavonóis, e seus derivados glicosilados e/ou acilados. A cinética de extracção destes compostos foi avaliada em dois chás dos Açores para tempos de infusão entre 5 min e 60 min. Testaram-se diferenças significativas na composição dos chás e correlações entre composição e actividade antioxidante.

A valorização de resíduos dos chás *Gorreana* como matérias-primas para a produção de suplementos nutracêuticos foi estudada efectuando a extracção de dois chás dos Açores e de dois resíduos de chá utilizando água, etanol acetona e suas misturas. Os resultados mostraram que a polaridade do solvente afectou significativamente o teor de polifenóis, actividade antioxidante e actividade antimicrobiana dos extractos. Os extractos de chá verde inibiram o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina), e observou-se uma correlacção forte entre teor de polifenóis e as actividades antioxidante e antimicrobiana de extractos de chá.

Palavras-chave: Chá; polifenóis; composição mineral; Actividade antioxidante; Actividade antimicrobiana; HPLC-DAD

Abstract

In this work it was studied the composition and antioxidant activity of green and black teas (8 from the Azores, and 11 from other sources), 4 red teas and 6 herbal infusions.

The mineral composition of the tea leaves and the corresponding infusions of 5 and 15 min was evaluated with respect to macroelements (K, Ca, Mg, Na) with nutritional value and aluminum (Al), and it was shown that concentration depends on the type of tea and the infusion time.

The antioxidant properties of teas and tisanes were evaluated by Folin-Ciocalteu reaction, the antiradical activity (DPPH) and ferric reduction activity (FRAP). These activities increased or decreased with time depending on the type of tea and infusion time which indicates different extraction kinetics and different degradation patterns of specific compounds.

Phenolic components of the teas were quantified by HPLC-DAD and grouped in families of catechins, methylxanthines, hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids, theaflavins, flavones, flavonols, and their glycosylated and/or acylated derivatives. The kinetics of extraction of these compounds was evaluated in two teas from Azores for infusion times from 5 min to 60 min. The existence of significant differences in the composition of teas as well as correlations between composition and antioxidant activity was tested.

The use of wastes from the Gorreana teas factory as raw materials for the production of nutraceutical supplements was studied by performing the extraction of the two Azorean teas and two tea residues using water, ethanol, acetone and mixtures thereof. The results showed that the polarity of the solvent significantly affected the polyphenol content, the antioxidant activity and the antimicrobial activity of the extract. The green tea extracts inhibited the growth of gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) and there was a strong correlation between polyphenol content and antioxidant and antimicrobial activity of the extracts.

Keywords: Tea; Polyphenols; Mineral composition; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; HPLC-DAD

Índice de Matérias

| | |
|--|-------|
| Direitos de cópia..... | iii |
| Epígrafe | v |
| Dedicatória | vii |
| Agradecimentos..... | ix |
| Resumo | xi |
| Abstract | xiii |
| Índice de Matérias | xv |
| Índice de Figuras | xix |
| Índice de Tabelas..... | xxiii |
| Lista de Siglas / Abreviaturas..... | xxxi |
| Capítulo 1 – Introdução Geral | 1 |
| 1.1 - O Chá: Origem e Processos de produção | 1 |
| 1.1.1 - Tipos de chá | 3 |
| 1.1.2 - O consumo de chá no mundo | 4 |
| 1.2 - O chá dos Açores | 4 |
| 1.2.1 - Chá Gorreana | 5 |
| 1.2.2 - Chá Barrosa..... | 6 |
| 1.2.3 - Chá Porto Formoso | 7 |
| 1.3 - O chá como alimento | 8 |
| 1.3.1 - Componentes orgânicos | 11 |
| 1.3.2 - Componentes inorgânicos | 12 |
| 1.4 - Efeito biológico do chá | 14 |
| 1.4.1 - Actividade antioxidante..... | 15 |
| 1.4.2 - Actividade antimicrobiana | 16 |
| 1.4.3 - Actividade antimutagénica e antiproliferativa | 17 |
| 1.4.4 - Outros efeitos | 18 |
| 1.4.5 - Efeitos nocivos do chá | 20 |
| Capítulo 2 – Composição mineral e nutricional de chás pretos e verdes dos Açores..... | 21 |
| 2.1 - Introdução | 21 |
| 2.1.1 – Determinação dos teores de humidade, de cinzas e de azoto | 23 |
| 2.1.2 - Teor de compostos fenólicos totais | 24 |
| 2.1.3 - Composição mineral..... | 27 |
| 2.1.4 - Efeito do método de infusão na composição (tempo, razão chá/água, temperatura) | 31 |
| 2.1.4.1 - Efeito da água na composição do chá | 32 |
| 2.2 - Parte Experimental | 34 |
| 2.2.1 – Amostragem | 34 |
| 2.2.2 – Preparação das infusões (5 min, 15 min)..... | 35 |
| 2.2.3 – Preparação do extracto aquoso (60 min) | 35 |
| 2.2.4 – Determinação do teor de humidade nas folhas | 35 |
| 2.2.5 - Determinação do extracto seco das infusões..... | 35 |
| 2.2.6 - Determinação de cinzas..... | 35 |
| 2.2.7 - Determinação do teor de fenóis totais | 35 |
| 2.2.8 - Determinação dos teores de fósforo e azoto das folhas..... | 36 |
| 2.2.8.1 - Determinação do teor de Ortofosfatos | 36 |
| 2.2.8.2 - Determinação do teor de Azoto Amoniacal | 36 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.9 - Determinação da composição mineral das folhas de chá e das infusões..... | 37 |
| 2.2.10 – Tratamento estatístico..... | 38 |
| 2.3 – Apresentação e Discussão de Resultados | 39 |
| 2.3.1 – Estudo da influência de parâmetros experimentais | 39 |
| 2.3.1.1 – Optimização de parâmetros da reacção de Folin-Ciocalteu - Variação do tempo de reacção no escuro e influência da centrifugação | 39 |
| 2.3.1.2 – Influência do Tempo de infusão no teor de fenólicos totais | 40 |
| 2.3.1.3 - Repetibilidade do método..... | 42 |
| 2.3.1.4 – Influência do Solvente na extracção dos fenólicos totais | 43 |
| 2.3.2 - Caracterização das folhas | 45 |
| 2.3.2.1 - Teor de Humidade..... | 45 |
| 2.3.2.2 - Teor de Cinzas..... | 47 |
| 2.3.2.3 – Teor de Fenólicos totais (Ext 50% acetona, 50% H ₂ O)..... | 48 |
| 2.3.2.4 - Teor de fósforo..... | 50 |
| 2.3.2.5 - Teor de azoto..... | 52 |
| 2.3.2.6 - Composição mineral das folhas (Mg, Al, Ca, Na, K) | 54 |
| 2.3.2.6.1 – Teor de Sódio | 55 |
| 2.3.2.6.2 – Teor de Magnésio..... | 56 |
| 2.3.2.6.3 – Teor de Alumínio..... | 58 |
| 2.3.2.6.4 – Teor de Potássio | 60 |
| 2.3.2.6.5 – Teor de Cálcio | 61 |
| 2.3.3 - Caracterização das infusões (5 e 15 minutos) e Extracto Aquoso..... | 64 |
| 2.3.3.1 - Peso seco | 64 |
| 2.3.3.2 - Teor de Cinzas..... | 67 |
| 2.3.3.3 – Teor de Fenólicos totais..... | 68 |
| 2.3.3.4 - Composição mineral das infusões de 5 e 15 minutos (Zn, Mg, Al, Cu, Ca, Na, K)..... | 72 |
| 2.3.3.4.1 – Teor de Sódio | 73 |
| 2.3.3.4.2 – Teor de Magnésio..... | 74 |
| 2.3.3.4.3 – Teor de Alumínio..... | 76 |
| 2.3.3.4.4 – Teor de Potássio | 78 |
| 2.3.3.4.5 – Teor de Cálcio | 80 |
| 2.3.3.4.6 – Teor de Cobre | 81 |
| 2.3.3.4.7 – Teor de Zinco | 83 |
| 2.4 - Conclusões | 86 |
| Capítulo 3 – Caracterização da actividade antioxidante de chás dos Açores e seu perfil dos compostos fenólicos | 89 |
| 3.1 – Introdução..... | 89 |
| 3.1.1 - Actividade antioxidante dos chás..... | 90 |
| 3.1.2 – Perfil de componentes fenólicos..... | 93 |
| 3.1.2.1 – Efeito da temperatura sobre os compostos fenólicos..... | 96 |
| 3.1.3 - Compostos bioactivos do chá..... | 98 |
| 3.2 - Parte Experimental | 108 |
| 3.2.1 - Amostragem | 108 |
| 3.2.2 – Preparação das infusões (0, 5, 15, 30 e 60 min) | 109 |
| 3.2.3 – Preparação do extracto aquoso (60 min) | 109 |
| 3.2.4 – Determinação do teor de fenólicos totais..... | 109 |
| 3.2.5 - Determinação da actividade antioxidante das infusões..... | 109 |
| 3.2.5.1 - Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)..... | 109 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.5.2 - Actividade antioxidante de redução férrica (FRAP) | 110 |
| 3.2.6 – Análise dos compostos fenólicos das infusões por HPLC..... | 110 |
| 3.2.6.1 – Preparação e análise das soluções padrão..... | 111 |
| 3.2.7 – Tratamento estatístico..... | 112 |
| 3.3 – Apresentação e Discussão de Resultados | 113 |
| 3.3.1 - Optimização de parâmetros experimentais..... | 113 |
| 3.3.1.1 – Optimização de parâmetros da reacção de Folin-Ciocalteu - Variação do tempo de reacção no escuro e influência da centrifugação | 113 |
| 3.3.1.2 – Optimização de parâmetros da reacção de DPPH* - Variação do tempo de reacção no escuro..... | 113 |
| 3.3.1.3 – Optimização de parâmetros da reacção de redução férrica (FRAP) - Variação do tempo de reacção no escuro..... | 114 |
| 3.3.1.4 –Repetibilidade..... | 115 |
| 3.3.2 - Actividade antioxidante de infusões de chás e tisanas | 116 |
| 3.3.2.1 – Fenólicos totais..... | 116 |
| 3.3.2.2 - Actividade antioxidante..... | 121 |
| 3.3.2.2.1 - Antiradicalar (DPPH*) | 122 |
| 3.3.2.2.2 - Redutora férrica (FRAP) | 127 |
| 3.3.2.3 – Efeito da moagem da folha na actividade biológica de infusões de 15 e 30 minutos em chás verdes dos Açores..... | 131 |
| 3.3.2.3.1 – Fenólicos totais..... | 131 |
| 3.3.2.3.2 - Actividade antioxidante..... | 132 |
| 3.3.2.3.2.1 - Antiradicalar (DPPH*) | 132 |
| 3.3.2.3.2.2 - Redutora férrica (FRAP) | 133 |
| 3.3.3 – Determinação de compostos fenólicos individuais em infusões e extractos aquosos de chá verde e preto | 134 |
| 3.3.3.1 - Compostos fenólicos presentes em diferentes chás preparados com um tempo de infusão de 15 min | 135 |
| 3.3.3.1.1 - Chás Verdes | 135 |
| 3.3.3.1.2 - Chás Pretos..... | 155 |
| 3.3.3.2 – Variação do perfil de compostos fenólicos em função do tempo de infusão..... | 178 |
| 3.3.3.2.1 – Chá Encosta da Bruma (Chá Verde)..... | 178 |
| 3.3.3.2.2 – Chá Broken Leaf (Chá Preto) | 186 |
| 3.3.3.3 - Compostos fenólicos presentes nos extractos aquosos preparados com um tempo de fervura de 1 hora..... | 196 |
| 3.3.3.3.1 - Chás Verdes | 196 |
| 3.3.3.3.2 - Chás Pretos..... | 201 |
| 3.4 - Conclusões | 207 |
| Capítulo 4 – Perfil dos compostos fenólicos e propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extractos de chás..... | 211 |
| 4.1 – Introdução..... | 211 |
| 4.2 - Parte Experimental | 222 |
| 4.2.1 - Amostragem | 222 |
| 4.2.2 – Preparação dos extractos | 222 |
| 4.2.3 – Determinação do rendimento e preparação de amostra para HPLC..... | 222 |
| 4.2.4 – Determinação do teor de compostos fenólicos totais | 222 |
| 4.2.5 - Determinação da actividade antioxidante dos extractos..... | 223 |
| 4.2.5.1 - Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) | 223 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.5.2 - Actividade antioxidante de redução férrica (FRAP) | 223 |
| 4.2.6 – Análise dos compostos fenólicos dos extractos por HPLC | 223 |
| 4.2.6.1 – Preparação e análise das soluções padrão..... | 223 |
| 4.2.7 - Determinação da actividade antimicrobiana dos extractos | 223 |
| 4.2.8 – Tratamento estatístico..... | 223 |
| 4.3 – Resultados | 224 |
| 4.3.1 – Determinação do rendimento de extracção..... | 224 |
| 4.3.2 - Actividade biológica de extractos de chás verde e preto e de dois resíduos da fábrica de chá (Gorreana) | 225 |
| 4.3.2.1 – Fenólicos totais | 226 |
| 4.3.2.2 - Actividade antioxidante..... | 227 |
| 4.3.2.2.1 - Antiradicalar (DPPH) | 227 |
| 4.3.2.2.2 - Redutora férrica (FRAP) | 229 |
| 4.3.3 – Determinação de compostos fenólicos individuais em extractos aquosos de chá verde e preto..... | 231 |
| 4.3.3.1 – Avaliação de compostos fenólicos através do perfil de HPLC-DAD..... | 231 |
| 4.3.3.2 – Identificação de famílias de compostos fenólicos no perfil de HPLC-DAD..... | 232 |
| 4.3.3.3 – Quantificação de compostos fenólicos individuais no perfil de HPLC-DAD | 235 |
| 4.3.4 - Actividade antimicrobiana de extractos de chás verde e preto e de dois resíduos da fábrica de chá (Gorreana) | 244 |
| 4.4 – Conclusões..... | 253 |
| Capítulo 5 - Conclusões..... | 255 |
| Bibliografia..... | 261 |
| Webgrafia | 285 |
| Anexos..... | 287 |
| Anexo I - Caracterização das folhas de chás verdes e pretos | 289 |
| Anexo II - Caracterização das infusões (5 min, 15 min): Peso seco, Extracto Aquoso, Teor de Cinzas, | 299 |
| Anexo III – Determinação de Fenólicos totais | 311 |
| Anexo IV – Determinação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH* | 317 |
| Anexo V – Determinação do poder redutor férrico (FRAP) | 321 |
| Anexo VI – Compostos individuais identificados nos chás verdes e pretos analisados..... | 325 |

Índice de Figuras

| | |
|---|-----|
| Figura 1. 1 - Estrutura dos polifenóis mais abundantes do chá | 9 |
| Figura 2. 1 – Variação do teor de fenólicos totais em função do tempo de incubação, no escuro, da reacção de Folin- Ciocalteu. | 40 |
| Figura 2. 2 – Evolução da concentração dos fenólicos totais, expresso em mg equivalentes de ácido gálico por litro de chá, ao longo do tempo (entre os 5 e os 30 minutos)..... | 41 |
| Figura 2. 3 - Teor de compostos fenólicos totais para diferentes amostras de chá “Gorreana – Encosta da Bruma” (chá verde) e “Pekoe” (chá preto) extraídos por diferentes solventes (n=2) e avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu e expresso em mg equivalentes de ácido gálico (mg/L) | 43 |
| Figura 2. 4 – Teor de humidade das amostras de chá analisadas | 45 |
| Figura 2. 5 - Teor de cinzas das amostras de chá analisadas..... | 47 |
| Figura 2. 6 - Teor de compostos fenólicos totais das amostras de chá analisadas..... | 49 |
| Figura 2. 7 - Teor de fósforo das amostras de chá analisadas | 51 |
| Figura 2. 8 - Teor de azoto das amostras de chá analisadas | 53 |
| Figura 2. 9 - Teor de sódio das amostras de chá analisadas | 55 |
| Figura 2. 10 - Teor de magnésio das amostras de chá analisadas..... | 57 |
| Figura 2. 11 - Teor de alumínio das amostras de chá analisadas..... | 59 |
| Figura 2. 12 - Teor de potássio das amostras de chá analisadas..... | 60 |
| Figura 2. 13 - Teor de cálcio das amostras de chá analisadas | 62 |
| Figura 2. 14 – Peso seco das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas..... | 64 |
| Figura 2. 15 – Extracto aquoso das amostras de analisadas | 66 |
| Figura 2. 16 – Teor de cinza das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas..... | 67 |
| Figura 2. 17 – Teor de fenólicos totais das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas..... | 69 |
| Figura 2. 18 – Teor de fenólicos totais das amostras de extracto aquoso analisadas | 71 |
| Figura 2. 19 – Teor de sódio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas | 73 |
| Figura 2. 20 – Teor de magnésio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas..... | 75 |
| Figura 2. 21 – Teor de alumínio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas..... | 77 |
| Figura 2. 22 – Teor de potássio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas..... | 78 |
| Figura 2. 23 – Teor de cálcio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas..... | 80 |
| Figura 2. 24 – Teor de cobre das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas | 82 |
| Figura 2. 25 – Teor de zinco das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas | 84 |
| Figura 3. 1 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b). | 93 |
| Figura 3. 2 – Estrutura base dos flavonoides (Ghedira, 2005) | 94 |
| Figura 3. 3 – Estrutura das principais classes de flavonoides (Cerqueira <i>et al.</i> , 2007; Ghedira, 2005) | 94 |
| Figura 3. 4 - Interconversão dos principais grupos de flavonoides (Adaptado de Rice-Evans <i>et al.</i> , 1997)..... | 95 |
| Figura 3. 5 – Epimerização reversível da estrutura de epicatequina (EGCG) numa estrutura de catequina (GCG) (Ananingsih <i>et al.</i> , 2013)..... | 97 |
| Figura 3. 6 – Estrutura química das catequinas primárias. (Perva-Uzunalic <i>et al.</i> , 2006)..... | 100 |
| Figura 3. 7 – Variação da % de inibição em função do tempo de incubação, no escuro, da reacção de DPPH’..... | 114 |
| Figura 3. 8 – Variação da absorvância em função do tempo de incubação da reacção de redução férrica (FRAP). | 114 |
| Figura 3. 9 – Teor de fenólicos totais das amostras de infusões de 5, 15 e 30 minutos analisadas..... | 117 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 10 – Teor de fenólicos totais das amostras de infusões de 5 minutos analisadas..... | 120 |
| Figura 3. 11 – Capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• das amostras de infusões de 5, 15 e 30 minutos analisadas..... | 123 |
| Figura 3. 12 – Capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• das amostras de infusões de 5 minutos analisadas..... | 125 |
| Figura 3. 13 – Poder redutor férrico (FRAP) das infusões de 5, 15 e 30 minutos analisadas. | 127 |
| Figura 3. 14 – Poder redutor férrico (FRAP) das infusões de 5 minutos analisadas. | 130 |
| Figura 3. 15 – Teor de fenólicos totais de infusões de 15 e 30 minutos de chá verde dos Açores..... | 132 |
| Figura 3. 16 – Capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 15 e 30 minutos de chá verde dos Açores | 132 |
| Figura 3. 17 – Poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 15 e 30 minutos de chá verde dos Açores | 133 |
| Figura 3. 18 – Cromatogramas de HPLC do chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) (A) e do chá comercial Verde Saludem (B) a 280 nm. | 136 |
| Figura 3. 19 Concentrações individuais (mg/L) dos componentes identificados a 280 nm que em alguma das infusões apresentam valores superiores a 50 mg/L. | 139 |
| Figura 3. 20 - Concentrações individuais (mg/L) dos componentes identificados a 280 nm que em nenhuma das infusões apresentam valores superiores a 50 mg/L | 140 |
| Figura 3. 21 – Teores médios de catequinas, metilxantinas, ácidos benzoicos, compostos não identificados presentes em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos..... | 143 |
| Figura 3. 22 – Cromatogramas de HPLC do chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) (A) e do chá comercial Verde Saludem (B) a 320 nm. | 144 |
| Figura 3. 23 - Concentrações individuais (mg/L) dos compostos identificados a 320 nm que em alguma das infusões apresentam valores superiores ou iguais a 6 mg/L. | 146 |
| Figura 3. 24 - Concentrações individuais (mg/L) dos compostos identificados a 320 nm que em alguma das infusões apresentam valores inferiores ou iguais a 6 mg/L. | 147 |
| Figura 3. 25 – Teores médios de ácidos hidroxicinâmicos, as flavonas glicosiladas e os flavonóis glicosilados acilados presentes em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos. | 148 |
| Figura 3. 26 – Percentagem relativa dos diferentes grupos de compostos analisados a 320 nm em infusões de 15 minutos de chás verdes..... | 149 |
| Figura 3. 27 – Cromatogramas de HPLC do chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) (A) e do chá comercial Verde Saludem (B) a 360 nm. | 150 |
| Figura 3. 28 - Compostos identificados e quantificados a 360 nm nos chás verdes..... | 152 |
| Figura 3. 29 – Percentagem relativa dos diferentes grupos de compostos detectados a 360 nm em infusões de 15 min de chás verdes. | 153 |
| Figura 3. 30 - Concentração média (%) dos compostos identificados nas infusões de 15 min preparadas a partir de chás verdes (em cima: chás analisados; em baixo da esquerda para a direita: Açores; comerciais; e comerciais adicionados). | 154 |
| Figura 3. 31 – Cromatogramas de HPLC do chá preto Broken Leaf (Gorreana) (A) e do chá comercial preto English Breakfast (B) a 280 nm. | 155 |
| Figura 3. 32 – Gráfico com as concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em alguma das infusões apresentam valores superiores a 20 mg/L. | 158 |
| Figura 3. 33 – Concentrações individuais de ácidos hidroxibenzóicos e metilxantinas presentes em chás pretos, na gama de 0 a 20 mg/L..... | 159 |
| Figura 3. 34 – Concentrações individuais de catequinas e teoflavinas presentes em chás pretos na gama de 0 a 20 mg/L. | 159 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3. 35 – Teores médios (%) de catequinas, metilxantinas, ácidos benzoicos e teoflavinas identificados em cada tipo de chá preto nas respectivas infusões de 15 minutos..... | 162 |
| Figura 3. 36 – Cromatogramas de HPLC do chá preto Broken Leaf (Gorreana) (A) e do chá comercial preto English Breakfast (B) a 320 nm. | 163 |
| Figura 3. 37 – Gráficos das concentrações individuais dos ácidos hidroxicinâmicos (mg/L) em infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás pretos. | 165 |
| Figura 3. 38 – Gráficos das concentrações individuais das flavonas glicosiladas (mg/L) em infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás pretos. | 166 |
| Figura 3. 39 – Gráficos das concentrações individuais dos flavonóis glicosilados e acilados glicosilados (mg/L) em infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás pretos..... | 166 |
| Figura 3. 40 – Teores médios (%) de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas, flavonóis glicosilados e flavonóis acilados glicosilados identificados em cada tipo de chá preto nas respectivas infusões de 15 minutos. | 168 |
| Figura 3. 41 – Cromatogramas de HPLC do chá preto Broken Leaf (Gorreana) (A) e do chá comercial preto English Breakfast (B) a 360 nm. | 169 |
| Figura 3. 42 – Concentrações individuais (mg/L), dos componentes identificados a 360 nm e que estão presentes em concentrações superiores a 10 mg/L..... | 171 |
| Figura 3. 43 – Concentrações individuais (mg/L), dos componentes identificados a 360 nm e presentes em concentrações inferiores a 10 mg/L..... | 171 |
| Figura 3. 44 - Concentração média (%) dos compostos identificados nas infusões de 15 min preparadas a partir de chás pretos (em cima: chás analisados; em baixo da esquerda para a direita: Açores; comerciais; e comerciais adicionados). | 174 |
| Figura 3. 45 – Evolução das concentrações das catequinas, metilxantina e ácidos hidroxibenzóicos maioritárias no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão (concentração acima de 20 mg/L). | 179 |
| Figura 3. 46 – Evolução das concentrações das catequinas, metilxantina e ácidos hidroxibenzóicos minoritárias no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão (concentração abaixo de 20 mg/L). | 179 |
| Figura 3. 47 – Evolução das concentrações dos ácidos hidroxicinâmicos no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão..... | 182 |
| Figura 3. 48 – Evolução das concentrações das flavonas glicosiladas e flavonóis glicosilados acilados no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão. | 183 |
| Figura 3. 49 – Evolução das concentrações dos compostos identificados a 360 nm cuja concentração fica acima de 6,0 mg/L no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão. | 185 |
| Figura 3. 50 – Evolução das concentrações dos compostos identificados a 360 nm cuja concentração fica abaixo de 6,0 mg/L no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão. | 185 |
| Figura 3. 51 – Evolução das concentrações das catequinas e ácidos hidroxibenzóicos maioritárias no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão. | 187 |
| Figura 3. 52 – Evolução das concentrações das catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos minoritárias no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão..... | 188 |
| Figura 3. 53 – Evolução das concentrações dos ácidos hidroxicinâmicos no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão. | 190 |
| Figura 3. 54 – Evolução das concentrações das flavonas no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão. | 191 |
| Figura 3. 55 Evolução das concentrações dos flavonóis acilados glicosilados no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão..... | 191 |
| Figura 3. 56 – Evolução das concentrações dos flavonóis glicosilados no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão e cuja concentração em solução ultrapassa os 5 mg/L..... | 194 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3. 57 – Evolução das concentrações dos flavonóis glicosilados no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão e cuja concentração em solução não ultrapassa os 5 mg/L..... | 194 |
| Figura 3. 58 - Concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em algum dos extractos apresentam valores superiores a 40 mg/L | 198 |
| Figura 3. 59 - Concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em nenhum dos extractos apresentam valores superiores a 40 mg/L | 198 |
| Figura 3. 60 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 320 nm correspondente aos compostos de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis acilados glicosilados identificados em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos. | 200 |
| Figura 3. 61 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 360 nm correspondente aos compostos de flavonóis glicosilados identificados em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos..... | 201 |
| Figura 3. 62 - Gráfico com as concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em algum dos extractos apresentam valores superiores a 20 mg/L | 202 |
| Figura 3. 63 - Gráfico com as concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em nenhum dos extractos apresentam valores superiores a 20 mg/L | 202 |
| Figura 3. 64 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 320 nm correspondente aos compostos de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis acilados glicosilados identificados em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos. | 204 |
| Figura 3. 65 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 360 nm correspondente aos compostos de flavonóis glicosilados identificados em cada tipo de chá preto nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos..... | 205 |
| Figura 3. 66 – Somatório das áreas absolutas médias dos chás verde e preto determinadas em HPLC-DAD aos comprimentos de onda utilizados na identificação de compostos (280 nm, 320 nm e 360 nm) para as infusões de 15 minutos e os extractos aquosos..... | 205 |
| Figura 4. 1 - Rendimento de extração de extractos obtidos com amostras de chá (“Encosta da Bruma” e Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura)..... | 224 |
| Figura 4. 2 - Teor de fenólicos totais de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura)..... | 226 |
| Figura 4. 3 - Actividade antiradicalar (DPPH•) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura)..... | 228 |
| Figura 4. 4 - Poder redutor férrico (FRAP) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura)..... | 229 |
| Figura 4. 5 – Cromatograma de HPLC do extracto de resíduo aspirado com acetona (50%) a 280 nm (A), a 320 nm (B) e a 360 nm (C). | 233 |
| Figura 4. 6 – Cromatograma de HPLC do extracto de resíduo aspirado com acetona (50%) a 280 nm (A), a 320 nm (B) e a 360 nm (C). | 236 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. 1 – Produção mundial de chá..... | 2 |
| Tabela 1. 2 – Alimentos com substâncias bioactivas e efeitos prováveis no organismo..... | 8 |
| Tabela 1. 3 - Tabela de Composição do chá..... | 10 |
| | |
| Tabela 2. 1 - Composição média (%) dos chás verde e preto e suas infusões | 22 |
| Tabela 2. 2 - Concentrações de fenólicos totais em extractos de folhas de chás verdes e pretos disponíveis em diversos países..... | 25 |
| Tabela 2. 3 – Gama de concentrações dos macroelementos (Al, Ca K, Mg, Mn, Na, P, S) em folhas de chá ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco) e infusões (%) em chás verdes e pretos disponíveis em diversos países . | 30 |
| Tabela 2. 4 – Gama de concentrações dos microelementos (Cr, Cu, Fe, Mo, Ni, Zn, Cd, As, Pb e Co) em folhas de chá ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco) e infusões (%) em chás verdes e pretos disponíveis em diversos países..... | 30 |
| Tabela 2. 5 – Identificação dos chás verdes e pretos estudados sob a forma de folhas secas ou infusões. | 34 |
| Tabela 2. 6 – Teor de compostos fenólicos totais para diferentes amostras de chá “Gorreana – Folha Enrolada” (n=10), avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu e expresso em mg equivalentes de ácido gálico (mg/L). | 42 |
| Tabela 2. 7 - Teor de compostos fenólicos totais para diferentes amostras de chá “Gorreana – Folha Enrolada” e o chá “Verde Menta” (n=5), avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu e expresso em mg equivalentes de ácido gálico (mg/L). | 43 |
| Tabela 2. 8 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de humidade dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 46 |
| Tabela 2. 9 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinzas dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 48 |
| Tabela 2. 10 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de compostos fenólicos dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção. | 50 |
| Tabela 2. 11 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fósforo dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 51 |
| Tabela 2. 12 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de azoto dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 53 |
| Tabela 2. 13 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de sódio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 56 |
| Tabela 2. 14 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de magnésio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 57 |
| Tabela 2. 15 - Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de alumínio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 59 |

| | |
|--|----|
| Tabela 2. 16 - Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de potássio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 60 |
| Tabela 2. 17 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cálcio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção..... | 62 |
| Tabela 2. 18 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos pesos secos dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 65 |
| Tabela 2. 19 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos extractos aquosos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 66 |
| Tabela 2. 20 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinza dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 68 |
| Tabela 2. 21 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 70 |
| Tabela 2. 22 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de fenólicos totais dos diferentes extractos aquosos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 72 |
| Tabela 2. 23 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de sódio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 74 |
| Tabela 2. 24 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de magnésio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 75 |
| Tabela 2. 25 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de alumínio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 77 |
| Tabela 2. 26 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de potássio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 79 |
| Tabela 2. 27 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cálcio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 81 |
| Tabela 2. 28 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cobre dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 82 |
| Tabela 2. 29 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de zinco dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 84 |
| Tabela 2. 30 - A ingestão esperada calculada de elementos com infusão de 5 minutos de chá e dose diária média recomendada de ingestão (DRI) para homens e mulheres de 19 a 50 anos de idade .. | 87 |
| Tabela 3. 1 - Compostos fenólicos totais (TPC) expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE), Capacidade Antioxidante expressa em equivalentes de ácido ascórbico (AEAC), Poder redutor do ferro (FRAP) e Capacidade quelante EC50 (CEC50) de chás de ervas de zonas tropicais e temperadas (Chan <i>et al.</i> , 2010)..... | 91 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 2 – Classe dos compostos fenólicos em plantas (Angelo & Jorge, 2007) | 93 |
| Tabela 3. 3 – Ocorrência de flavonoides em alimentos (Sandhar <i>et al.</i> , 2011; Ioannou & Ghoul, 2012; Kumar & Pandey, 2013; Volp <i>et al.</i> , 2008; Rossi <i>et al.</i> , 2007)..... | 95 |
| Tabela 3. 4 – Composição média da bebida chá (% peso seco/sólidos totais) (Harbowy & Balentine, 1997)..... | 98 |
| Tabela 3. 5 – Principais constituintes do chá (% peso seco) (Liebert <i>et al.</i> , 1999; Dufresne <i>et al.</i> , 2001; Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Shukla, 2007)..... | 99 |
| Tabela 3. 6 - Tipos de colunas, eluentes e comprimentos de onda e/ou gamas de comprimentos de onda indicados nos diferentes artigos para a determinação dos componentes do chá por HPLC..... | 102 |
| Tabela 3. 7 - Compostos, formulas e pesos moleculares e comprimentos de onda e/ou gamas de comprimentos de onda identificados no chá por HPLC..... | 103 |
| Tabela 3. 8 – Identificação dos chás verdes, pretos e vermelhos e tisanas estudados sob a forma de infusões..... | 108 |
| Tabela 3. 9 – Inibição do radical DPPH [•] expressa em % e do poder redutor férrico expresso em mg GAE/L infusão, para diferentes amostras de chá Gorreana – Folha Enrolada (n=8). | 115 |
| Tabela 3. 10 – Média, desvio padrão e desvio relativo das áreas absolutas dos picos identificados a 280 nm nos chás dos Açores Encosta da Bruma (chá verde) e Broken Leaf (chá preto)..... | 116 |
| Tabela 3. 11 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais dos diferentes tipos de infusões, de 5, 15 e 30 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 118 |
| Tabela 3. 12 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais dos diferentes tipos de infusões, de 5 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 121 |
| Tabela 3. 13 – Médias, desvios-padrão da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH [•] dos diferentes tipos de infusões de 5, 15 e 30 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 124 |
| Tabela 3. 14 – Médias, desvios-padrão da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH [•] das infusões de 5 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 126 |
| Tabela 3. 15 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP) dos diferentes tipos de infusões de 5, 15 e 30 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção. | 129 |
| Tabela 3. 16 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP) dos diferentes tipos de infusões de 5 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção..... | 130 |
| Tabela 3. 17 – Padrões utilizados, janelas de retenção, rectas de calibração, coeficientes de correlação e gamas de concentração utilizadas na calibração..... | 135 |
| Tabela 3. 18 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 280 nm. | 137 |
| Tabela 3. 19 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 280 nm nos chás verdes. | 142 |
| Tabela 3. 20 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 320 nm. | 145 |
| Tabela 3. 21 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 320 nm nos chás verdes. | 149 |
| Tabela 3. 22 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 360 nm. | 151 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 3. 23 – Média, desvios-padrão e coeficientes das áreas cromatográficas determinadas a 360 nm para os diferentes chás analisados | 151 |
| Tabela 3. 24 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 360 nm nos chás verdes. | 153 |
| Tabela 3. 25 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás pretos ao comprimento de onda de 280 nm. | 156 |
| Tabela 3. 26 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 280 nm nos chás pretos..... | 161 |
| Tabela 3. 27 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 320 nm. | 164 |
| Tabela 3. 28 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 320 nm nos chás pretos..... | 167 |
| Tabela 3. 29 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás pretos ao comprimento de onda de 360 nm. | 170 |
| Tabela 3. 30 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 360 nm nos chás pretos..... | 173 |
| Tabela 3. 31 - Teor dos compostos identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes e pretos expressos em mg/L e em %. | 174 |
| Tabela 3. 32 - Médias dos somatórios das áreas cromatográficas a 280 nm, 320 nm e 360 nm nos chás verdes e pretos analisados. | 176 |
| Tabela 3. 33 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os somatórios das áreas determinadas a 280 nm, 320 nm e a 360 nm dos chás | 177 |
| Tabela 3. 34 - Compostos tentativamente identificados no chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 280 nm. | 178 |
| Tabela 3. 35 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá verde Encosta da Bruma..... | 181 |
| Tabela 3. 36 - Compostos tentativamente identificados no chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 320 nm. | 181 |
| Tabela 3. 37 - Variação da concentração média de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá verde Encosta da Bruma..... | 183 |
| Tabela 3. 38 - Compostos tentativamente identificados no chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 360 nm. | 184 |
| Tabela 3. 39 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas, flavonóis glicosilados acilados e de flavonóis glicosilados com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá verde Encosta da Bruma..... | 186 |
| Tabela 3. 40 - Compostos tentativamente identificados no chá preto Broken Leaf (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 280 nm..... | 187 |
| Tabela 3. 41 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá preto Broken Leaf..... | 189 |
| Tabela 3. 42 - Compostos tentativamente identificados no chá preto Broken Leaf (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 320 nm..... | 190 |
| Tabela 3. 43 - Variação da concentração média de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis glicosilados acilados com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá preto Broken Leaf..... | 192 |
| Tabela 3. 44 - Compostos tentativamente identificados no chá preto Broken Leaf (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 360 nm..... | 193 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 3. 45 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas, flavonóis glicosilados acilados e de flavonóis glicosilados com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá preto Broken Leaf..... | 195 |
| Tabela 3. 46 - Compostos tentativamente identificados em extractos aquosos de chás verdes ao comprimento de onda de 280 nm.Tabela | 197 |
| Tabela 3. 47 - Concentração média, em mg/L, de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos dos extractos aquosos de chá verde | 199 |
| Tabela 3. 48 - Compostos tentativamente identificados em extractos aquosos de chás verdes ao comprimento de onda de 280 nm. | 201 |
| Tabela 3. 49 - Concentração média, em mg/L, de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos dos extractos aquosos de chá verde | 204 |
| | |
| Tabela 4. 1 - Factores que influenciam a extracção dos polifenóis do chá produzido a partir da <i>Camellia sinensis</i> | 213 |
| Tabela 4. 2 – Identificação das amostras (chás e resíduos) estudados sob a forma de extractos. | 222 |
| Tabela 4. 3 - Médias dos rendimentos de extracção obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) para diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol)..... | 225 |
| Tabela 4. 4 - Médias dos teores de fenólicos totais de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) com diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol), expressos em mg/g de extracto seco..... | 226 |
| Tabela 4. 5 - Médias da actividade antiradicalar (DPPH•) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) com diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol), expressos em mg/g de extracto seco. | 228 |
| Tabela 4. 6 - Médias do poder redutor férrico (FRAP) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) com diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol), expressos em mg/g de extracto seco. | 229 |
| Tabela 4. 7 - Correlações de Pearson entre o rendimento de extracção e as propriedades antioxidantes para os extractos analisados. | 230 |
| Tabela 4. 8 - Areas cromatográficas para cada um dos comprimentos de onda seleccionados (280 nm, 320 nm e 360 nm) em função do solvente utilizado..... | 231 |
| Tabela 4. 9 - Areas cromatográficas para cada um dos comprimentos de onda seleccionados (280 nm, 320 nm e 360 nm) em função do extracto (amostra/solvente). | 231 |
| Tabela 4. 10 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes dos extractos analisados e os somatórios a 280nm, 320 nm e 360 nm..... | 232 |
| Tabela 4. 11 - Concentração de cada família de compostos, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente. | 234 |
| Tabela 4. 12 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes dos extractos analisados e as famílias detectadas por HPLC..... | 235 |
| Tabela 4. 13 - Compostos tentativamente identificados nos extractos analisados (amostra/solvente) aos comprimentos de onda de 280 nm, 320 nm e 360 nm..... | 237 |
| Tabela 4. 14 - Concentração dos ácidos hidroxibenzóicos, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente. | 238 |
| Tabela 4. 15 - Concentração das catequinas identificadas nos extractos, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente..... | 238 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 4. 16 - Concentração das metilxantinas, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente..... | 240 |
| Tabela 4. 17 - Concentração da teoflavina, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente..... | 240 |
| Tabela 4. 18 - Concentração do ácido hidroxicinâmico, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente..... | 241 |
| Tabela 4. 19 - Concentração dos flavonóis glicosilados acilados, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente, para cada um dos compostos detectados com este grupo funcional..... | 241 |
| Tabela 4. 20 - Concentração do flavonol, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente..... | 242 |
| Tabela 4. 21 - Concentração dos flavonóis glicosilados, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente, para cada um dos compostos detectados com este grupo funcional..... | 242 |
| Tabela 4. 22 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes dos extractos analisados e os compostos fenólicos determinados..... | 243 |
| Tabela 4. 23 - Actividade antimicrobiana dos extractos de água e de soluções aquosas de etanol e de acetona (50%)..... | 244 |
| Tabela 4. 24 - Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina e as propriedades antioxidantes para os extractos analisados..... | 247 |
| Tabela 4. 25 - Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina e os somatórios determinados a 280 nm, 320 nm e 360 nm para os extractos analisados..... | 247 |
| Tabela 4. 26 - Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina e as famílias de compostos observadas nos extractos analisados..... | 248 |
| Tabela 4. 27 Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina e os compostos determinados nos extractos analisados..... | 249 |
| | |
| Tabela A. 1 - Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de humidade das amostras de folhas de chá analisadas | 290 |
| Tabela A. 2 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de humidade das amostras de folhas de chá analisadas | 291 |
| Tabela A. 3 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de compostos fenólicos totais de extractos de acetona (50%) das amostras de folhas de chás analisadas | 292 |
| Tabela A. 4 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fósforo das amostras de chá folhas de chás analisadas | 293 |
| Tabela A. 5 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fósforo das amostras de chá folhas de chás analisadas | 294 |
| Tabela A. 6 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de proteína das amostras de folhas de chá analisadas | 295 |
| Tabela A. 7 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas amostras de folhas de chás analisadas | 295 |
| Tabela A. 8 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas amostras de folhas de chás analisadas | 296 |

| | |
|--|-----|
| Tabela A. 9 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Al, Ca e Na nas amostras de folhas de chás analisadas | 297 |
| Tabela A. 10 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de metal K nas amostras de folhas de chás analisadas | 298 |
| Tabela A. 11 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de peso seco das infusões de 5 minutos analisadas | 300 |
| Tabela A. 12 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de peso seco das infusões de 15 minutos analisadas | 301 |
| Tabela A. 13 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de peso seco das infusões do extractos aquosos analisados | 302 |
| Tabela A. 14 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinzas das infusões de 5 minutos analisadas..... | 303 |
| Tabela A. 15 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinzas das infusões de 15 minutos analisadas..... | 304 |
| Tabela A. 16 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas infusões de 5 minutos analisadas..... | 305 |
| Tabela A. 17 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Al, Ca e Na nas infusões de 5 minutos analisadas..... | 306 |
| Tabela A. 18 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de metal K nas infusões de 5 minutos analisadas..... | 307 |
| Tabela A. 19 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas infusões de 15 minutos analisadas..... | 308 |
| Tabela A. 20 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Al, Ca e Na nas infusões de 15 minutos analisadas..... | 309 |
| Tabela A. 21 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de metal K nas infusões de 15 minutos analisadas..... | 310 |
| Tabela A. 22 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de infusões de 5 minutos de chás verdes, chás pretos, chás vermelhos e tisanas analisados | 312 |
| Tabela A. 23 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados..... | 313 |
| Tabela A. 24 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados..... | 314 |
| Tabela A. 25 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de extractos aquosos de chás verdes e chás pretos analisados | 315 |
| Tabela A. 26 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 5 minutos de chás verdes, chás pretos, chás vermelhos e tisanas analisados | 318 |
| Tabela A. 27 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados | 319 |
| Tabela A. 28 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 30 minutos de chás verdes e chás pretos analisados | 320 |
| Tabela A. 29 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 5 minutos de chás verdes, chás pretos chás vermelhos e tisanas analisados | 322 |
| Tabela A. 30 Médias, desvios-padrão e coeficientes de poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados..... | 323 |

| | |
|---|-----|
| Tabela A. 31 Médias, desvios-padrão e coeficientes de poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 30 minutos de chás verdes e chás pretos analisados..... | 324 |
| Tabela A. 32 Concentração média dos teores de compostos individuais identificados nos chás verdes, expresso em mg/L. | 326 |
| Tabela A. 33 Concentração média dos teores de compostos individuais identificados nos chás pretos, expresso em mg/L | 328 |

Lista de Siglas / Abreviaturas

µg – Micrograma
AAE - Equivalentes de ácido ascórbico
ABTS - Radical, 2,2-azinobis-3-etil-benzothiazoline-6-sulfónico
ADN – Ácido desoxirribonucleico
AEAC – Actividade anti-radicalar
Al – Alumínio
ANOVA - Análise de variância
AOAC - Association of Official Agricultural Chemists (Associação dos Químicos Agrícolas Oficiais)
As - Arsénio
ASP – Resíduo de fábrica aspirado
Assam OP – Assam Orange Pekoe
ATP – Adenosina-trifosfato
AVC – Acidente Vascular Cerebral
B - Boro
Ba – Bário
BHT - Hidroxitolueno butilado
Bi – Bismuto
BL – Chá preto Broken Leaf
C – Carbono
Ca - Cálcio
CaCO₃ - Carbonato de cálcio
Cd - Cádmiio
CE – Epicatequina
Ce - Cério
CEC₅₀ – Capacidade quelante EC₅₀
CG – Galocatequina
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMRG - Câmara Municipal da Ribeira Grande
Co – Cobalto
CO₂ - Dióxido Carbono
Coluna C18 – Coluna cuja fase estacionária é formada por octadecil-Silil (-Si-(CH₂)₁₇-CH₃)
Cr – Crómio
Cs – Césio
Cu - Cobre
d – Dia
DAD – Diode-Array Detection (Detecção por arranjo de diodos)
DMF - N,N-dimetilformamida
DPPH - Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRI - Dose diária média recomendada de ingestão
EB – Chá verde Encosta da Bruma
EC – Epicatequina
EC₅₀ – Metade da concentração máxima
ECG - Galato de epicatequina
EGC – Epigalocatequina
EGCG - Galato de epigalocatequina ou epigalocatequina- galato
Eu -Euleutério

F - Flúor

FAO – *Food and Agriculture Organization* (Organização para a Alimentação e Agricultura)

Fe – Ferro

FIC – Poder de quelação do ião ferroso

FPS - Factor de Proteção Solar

FRAP - Poder antioxidante por redução do ião férrico/Poder redutor do ião férrico

FTC - Método de tiocianato férrico

g – Grama

Ga – Gálio

GAE – Equivalentes de ácido gálico

GAE/L – Equivalentes de ácido gálico

GC – *Gas Chromatography* (Cromatografia gasosa)

GC – Galocatequina

GCG – Galocatequina Galato

H - Hidrogénio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HDL – High Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)

Hg – Mercúrio

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imuno-deficiência humana)

HNO₃ - Ácido nítrico

HPCE – High-Performance Capillary Electrophoresis (Electroforese capilar de alta eficiência)

HPLC - High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alto desempenho)

HPLC-DAD - High Performance Liquid Chromatography-Diode-Array Detection (Cromatografia líquida de alto desempenho com díodos de detecção)

HPLC-RP - High Performance Liquid Chromatography-Reverse Phase (Cromatografia líquida de alto desempenho em fase reversa)

HPLC-UV - High Performance Liquid Chromatography- *UV* Detector (Cromatografia líquida de alto desempenho com detector ultravioleta)

HSCCC - High-Speed Counter-Current Chromatograph (Cromatografia contracorrente de alto desempenho)

I - Iodo

K – Potássio

kcal – Quilocalorias

kg - Quilograma

kJ – Quilojoule

La – Lactanídeo

LC-MS – Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Cromatografia líquida associada a espectrometria de massa)

LDL – *Low-Density Lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)

M – mol/L – moles de soluto por litro

m/m – Massa por massa

MEKC - Micellar Electrokinetic Chromatography (Cromatografia eletrocinética micelar)

Mg – Magnésio

mg – Miligrama

mg/L – Miligrama por litro

MIC - Concentração mínima inibitória

min – Minutos
mL – Mililitro
mM – mmol/L - Milimoles de soluto por litro
Mn – Manganês ou manganésio
MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina)
MSSA - *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina)
N - Azoto
Nb - Nióbio
ng – Nanograma
NH₄⁺ - Ião amónia
Ni – Níquel
nm – Nanómetro
O - Oxigénio
ODS-HG – Coluna C18 de fase reversa
ORAC – Capacidade antioxidante do radical oxigénio
P – Fósforo
Pb - Chumbo
PDA – Photodiode Array Detector (Detecção por arranjo de fotodiodos)
pH – Potencial do ião H⁺
Pr - Praseodímio
PTWI - Provisional Tolerable Weekly Intake (Ingestão Semanal Tolerável Provisória)
QE – Equivalentes de quercetina
Rb – Rubídio
Rb – Rubídio
Reagente ACS - Reagente que segue as especificações da Sociedade Americana de Química
Reagente ISO - Reagente que segue as especificações da Organização Internacional de Padronização
Reagente PA - Reagente pró-análise
sd – Sem data
Se – Selénio
SGF – Simulated Gastric Fluid (Fluido gástrico simulado)
Si - Silício
SIF – Simulated Intestinal Fluid (Fluido intestinal simulado)
SMS - Sodium Metabisulphite (Metabissulfito de sódio)
SPME - Solid Phase Micro Extraction (Método microextração em fase sólida)
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences (Pacote estatístico para as ciências sociais)
Sr – Estrôncio
Srs – Senhores
TEAC – *Trolox* Equivalent. *Antioxidant* Capacity (*Capacidade antioxidante* equivalente ao *Trolox*)
Ti – Titânio
Tl – Tálio
TPC – Total Phenolic Compounds (Teor de compostos fenólicos totais)
tR – Tempo de retenção
UHPLC - Ultra High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra-Alto Desempenho)
UK – Reino Unido
USD – Dólares dos Estados Unidos

UV - Ultravioleta

UV-VIS – Ultravioleta e visível

V – Vanádio

VAR – Resíduo de fábrica Varredura

Vari – Variante

WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

Y - Ítrio

Zn – Zinco

$\lambda_{\text{máx.}}$ – Comprimento de onda máximo

μL – Microlitro

Capítulo 1 – Introdução Geral

1.1 - O Chá: Origem e Processos de produção

Segundo a história chinesa, o chá foi descoberto, por acaso, por Shen Nong, imperador chinês que viveu há cerca de 5000 anos atrás. Conta-se que o imperador durante uma viagem pelos seus domínios parou para descansar, encostando-se debaixo de uma árvore de *Camellia sinensis*. Pediu aos seus servidores um pouco de água fervida para tomar. Uma folha desprende-se da árvore caindo na sua chávena de água ainda quente. O imperador apesar de a água ficar amarelada bebeu e gostou pelo que, a árvore da *Camellia sinensis* passou a ser considerada como árvore do chá (Phillips, 2007).

O termo chá, usado em Portugal, provém de um dos poucos vocábulos do cantonês, «Tchá», integrados na língua portuguesa. Este termo é associado normalmente a qualquer preparado feito com uma porção de água em ebulição, à qual se adiciona uma determinada quantidade de folhas, flores, inflorescências ou mesmo uma planta inteira, e que é deixada em infusão, por mais ou menos tempo. Rigorosamente, estas preparações deviam designar-se como tisanas sendo o termo chá reservado para as infusões das folhas da planta do chá, a *Camellia sinensis*, que os chineses aperfeiçoaram ao longo de milénios recorrendo a técnicas requintadas (Anónimo, 2008).

Os principais países produtores de chá são a China, a Índia, o Ceilão, a Cochinchina (região que engloba a região sul do Vietname) e as ilhas de Sunda. Na produção desta bebida, o chá ou as folhas do arbusto são secas imediatamente a seguir à colheita (chá verde) ou depois de haver uma ligeira fermentação (chá preto). O chá era desconhecido na Europa antes da segunda metade do século XVII mas o seu consumo generalizou-se rapidamente (Séguier, 2001). Actualmente o chá é uma bebida amplamente utilizada, sendo a segunda bebida mais consumida no mundo, depois da água (Lamarão & Fialho, 2009). A produção mundial de chá tem aumentado desde 1994 até 2007 (Tabela 1.1). Os seis maiores produtores mundiais de chá em 2007 foram: a China (1183502 toneladas), a Índia (949220 toneladas), o Quênia, o Sri Lanka, a Turquia e o Vietname. A produção de chá em Portugal é de apenas 125 toneladas, apesar de ter vindo a aumentar desde 1994, à semelhança da produção mundial (FAO, 2009a; FAO, 2009b).

Tabela 1. 1 – Produção mundial de chá (Adaptado de FAO, 2009a)

| Países | Produção de chá (toneladas) | | | | |
|--------------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 1994-1996 | 1999-2001 | 2005 | 2006 | 2007 |
| África do Sul | 10 784 | 12 421 | 21 780 | 3 328 | 4 200 |
| Argentina | 49 846 | 67 058 | 67 871 | 72 129 | 72 000 |
| Azerbaijão | 3 595 | 1 745 | 737 | 655 | 484 |
| Bangladesh | 50 063 | 51 333 | 57 580 | 58 000 | 58 500 |
| Bolívia | 692 | 830 | 866 | 872 | 889 |
| Brasil | 8 198 | 7 919 | 4 473 | 4 052 | 1 083 |
| Burundi | 6 499 | 7 681 | 7 500 | 7 500 | 7 700 |
| Camarões | 3 674 | 4 267 | 4 000 | 4 000 | 4 000 |
| China | 612 954 | 707 400 | 953 660 | 1047 345 | 1183 502 |
| Colômbia | | 103 | 120 | 118 | 150 |
| República Democrática do Congo | 3 418 | 1 892 | 1 570 | 1 760 | 1 760 |
| Equador | 3 090 | 1 368 | 1 855 | 1 870 | 1 925 |
| Etiópia | 1 867 | 3 786 | 4 800 | 4 800 | 4 800 |
| Geórgia | 44 733 | 35 777 | 22 755 | 6 600 | 7 500 |
| Guatemala | 447 | 450 | 440 | 450 | 480 |
| Índia | 754 300 | 849 000 | 893 000 | 928 000 | 949 220 |
| Indonésia | 153 164 | 162 218 | 177 700 | 146 858 | 150 224 |
| República Islâmica do Irão | 57 352 | 54 240 | 59 180 | 59 180 | 60 000 |
| Japão | 86 567 | 86 167 | 100 000 | 91 800 | 94 100 |
| Quênia | 237 037 | 259 869 | 328 500 | 310 580 | 369 600 |
| Coreia, República | 782 | 1 298 | 1 500 | 1 500 | 1 550 |
| República Democrática do Lao | 936 | 272 | 300 | 300 | 300 |
| Madagáscar | 300 | 444 | 550 | 560 | 550 |
| Malawi | 34 708 | 39 233 | 38 000 | 45 009 | 46 000 |
| Malásia | 5 800 | 5 652 | 2 850 | 2 850 | 2 850 |
| Mali | 156 | 57 | 135 | 135 | 135 |
| Mauritânia | 3 790 | 1 434 | 1 387 | 1 567 | 1 563 |
| Moçambique | 1 549 | 7 032 | 16 000 | 16 256 | 16 256 |
| Myanmar | 15 733 | 19 575 | 25 000 | 26 500 | 27 000 |
| Nepal | 2 510 | 5 405 | 12 500 | 13 043 | 15 168 |
| Panamá | 155 | 110 | 234 | 141 | 145 |
| Papua Nova Guiné | 6 104 | 9 500 | 9 000 | 9 000 | 9 000 |
| Peru | 7 356 | 6 567 | 4 236 | 4 820 | 3 597 |
| Portugal | 62 | 120 | 112 | 115 | 125 |
| Federação Russa | 6 804 | 1 587 | 1 260 | 1 150 | 630 |
| Ruanda | 6 202 | 15 085 | 16 458 | 16 000 | 19 000 |
| Seychelles | 232 | 238 | 219 | 189 | 222 |
| Sri Lanka | 248 867 | 294 897 | 317 200 | 310 800 | 305 220 |
| República Unida da Tanzânia | 24 367 | 24 700 | 30 700 | 30 300 | 31 300 |
| Tailândia | 5 100 | 5 533 | 6 000 | 6 000 | 6 000 |
| Turquia | 117 201 | 160 275 | 217 540 | 201 866 | 206 160 |
| Uganda | 14 524 | 28 944 | 37 734 | 34 334 | 35 000 |
| Vietname | 43 000 | 71 967 | 132 525 | 151 000 | 164 000 |
| Zâmbia | 483 | 800 | 800 | 750 | 750 |
| Zimbábwe | 15 086 | 20 977 | 22 200 | 22 000 | 22 300 |
| Mundo | 2 650 455 | 3 037 592 | 3 603 197 | 3 646 452 | 3 887 308 |

1.1.1 - Tipos de chá

O chá é comercializado em todo o mundo e é composto por folhas secas da árvore do chá (*Camellia sinensis*), pequena árvore da família das *Teaceas*, e dos seus híbridos. As cerca de 3000 variedades existentes em todo o mundo diferem em sabor e características em função da área geográfica de origem, das condições atmosféricas, da variedade e até mesmo da altitude a que a planta é produzida.

O chá proveniente da *Camellia sinensis* pode ser classificado em três tipos, segundo o seu nível de fermentação ou oxidação (Lamarão & Fialho, 2009):

- chá verde, que não sofre fermentação durante o processamento e deste modo retém a cor original das folhas, sendo amplamente consumido em países da Ásia;
- chá oolong, que é parcialmente fermentado, resultando em chá verde – preto, e cuja produção e consumo são acentuados na China;
- chá preto, cujo processo de fermentação é mais prolongado do que o do chá oolong, contribuindo assim para uma coloração escurecida, além de lhe conferir um sabor característico. Este tipo de chá é mais popular na América do Norte e Europa.

Podemos ainda diferenciar (Sharangi, 2009):

- ✓ chá branco, em que os brotos e folhas de chá jovens são colhidos pouco antes dos brotos abrirem totalmente. Em seguida as folhas são secas ao vapor e com o mínimo de processamento. Por esta razão, o chá branco conserva os níveis mais elevados de antioxidantes e os níveis mais baixos de cafeína do que qualquer outro chá da planta de *Camellia sinensis* (verde, preto ou oolong);
- ✓ chá pu'erh, que provém de uma grande variedade de folhas da planta de chá e pode ser colhido em qualquer época do ano. O seu tratamento é semelhante ao do chá preto. O que torna este chá único é que uma vez colhido, é empilhado e armazenado durante um período de tempo que varia entre 50 a 100 anos.

O chá vermelho ou rooibos é designado como chá mas, na verdade, deveria chamar-se tisana pois não resulta da infusão de folhas da planta *Camellia sinensis* mas sim de *Aspalathus linearis*, um arbusto originário de Cedarberg na província do Cabo Ocidental na África do Sul. Não contém cafeína e possui um número elevado de antioxidantes. Verifica-se ainda que quanto maior o grau de fermentação das folhas, menor o teor de polifenóis e maior o teor de cafeína (Fukasawa *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2014)

No caso dos chás produzidos no Arquipélago dos Açores, a diferenciação dos chás pretos é feita pela selecção das folhas: da primeira folha do ramo a partir do rebento é extraído o *Orange Pekoe*, chá muito aromático e muito leve, da segunda é extraído o *Pekoe*, menos aromático mas de sabor mais intenso e da terceira folha é extraído o *Broken Leaf*, chá de aroma e sabor mais leve e pobre em teína (Anónimo, 2011). Estes tipos de chá apresentam diferenças organolépticas a nível da cor e do aroma mas podem todos ser considerados bebidas com propriedades funcionais uma vez que contêm compostos antioxidantes, nomeadamente, catequinas.

Wang e colaboradores (2008) caracterizaram algumas variedades de chá verde, chá oolong e chá preto por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para identificação e quantificação de catequinas, e por microextração em fase sólida associada à cromatografia em fase gasosa (SPME-GC) para caracterização de compostos voláteis responsáveis pelo aroma. Estes investigadores concluíram que, nem os teores das catequinas totais nem os teores individuais das catequinas permitiram diferenciar os vários tipos de chá, pois não apresentaram diferenças significativas. No entanto observaram que o processo de fermentação altera significativamente os perfis de compostos voláteis, e portanto o aroma

dos vários chás. Verificaram que os teores de cinco compostos voláteis, nomeadamente, o trans-2-hexenal, o benzaldeído, a 5-metil-2-heptenona, o salicilato de metilo, e o indole permitem diferenciar claramente um chá fermentado de um não fermentado, enquanto o trans-2-hexenal e o salicilato de metilo permitem diferenciar os chás fermentados entre si (Wang *et al.*, 2008a).

1.1.2 - O consumo de chá no mundo

Actualmente o chá é uma bebida amplamente consumida, apresentando um consumo mundial *per capita* de aproximadamente 120 mL/dia (Lamarão & Fialho, 2009). Do chá produzido no mundo, 78% é chá preto, geralmente consumido nos países ocidentais, 20% é chá verde, mais consumido em países asiáticos, e 2% é chá Oolong que é produzido (por fermentação parcial), principalmente no sul da China (Khan *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009).

Os valores de importação e exportação de chá dos diversos países do mundo referenciados pela FAO (184 países) têm vindo a aumentar nas últimas décadas. O maior importador de chá é a Federação Russa, seguido da Grã-Bretanha, Estados Unidos da América, Paquistão, Japão, Arábia Saudita e Alemanha. Por sua vez o maior exportador de chá é o Quênia, seguido da China, Sri Lanka, Índia, Grã-Bretanha e Alemanha. Para qualquer dos países mencionados as transações são superiores a 150 milhões de dólares dos Estados Unidos (\$USD). No que se refere a Portugal as suas importações e exportações de chá cresceram significativamente. De facto as importações cresceram de 505000 \$USD, em 1994 para 5641000 \$USD em 2007, enquanto as exportações cresceram de 49000 \$USD para 1194000 \$USD no mesmo período (FAO, 2009b).

1.2 - O chá dos Açores

As primeiras sementes de chá terão vindo do Brasil em 1820 e chegado aos Açores, nomeadamente à ilha de São Miguel, por intermédio de Jacinto Leite, comandante da guarda real, na corte de D. João VI, no Rio de Janeiro. O local escolhido para a sementeira foi a freguesia das Calhetas, concelho da Ribeira Grande, onde o comandante era possuidor de vários terrenos (Enciclopédia Açoriana, sd e Cabido, 1913). Há também quem sustente que, embora com a mesma proveniência, a semente fora trazida por um serviçal do morgado João Soares, que com ela pretendeu presentear o seu antigo amo, sendo semeada no lugar de Santo António, onde se desenvolveu bem, passando então para uma grande propriedade do lugar das Capelas, propriedade de Soares de Amorim, e onde se multiplicou como planta ornamental, sendo daí originária toda a semente das plantações que depois se fizeram nesta ilha (Cabido, 1913).

Tida como planta de ornamentação, o incremento da sua produção só veio a verificar-se na segunda metade do século XIX, quando o comércio da laranja entrou em declínio, e foi necessário pensar em outras opções para a sua substituição, nomeadamente no chá, no tabaco, no álcool da batata-doce (Oliveira, sd). A Sociedade Promotora de Agricultura Micaelense decidiu em 15 de Abril de 1874 começar ensaios de cultura e produção do chá (Cabido, 1913). Um grupo de 6 famílias, entre as quais a família Gorreana, iniciou a produção de chá entre 1875 e 1876 (Oliveira, sd). A Sociedade Promotora contratou dois chineses de Macau (Arquivo Digital, sd) que chegaram a S. Miguel a 5 de Março de 1878 e encontraram a folha de chá das culturas experimentais, tendo iniciado os trabalhos da sua preparação (Cabido, 1913). A planta do chá vingou na ilha, de modo particular nas encostas norte de S. Miguel, sob influência de uma série de elementos favoráveis ao seu cultivo, como o clima, o relevo e a qualidade do solo (Sousa, 2012). O aparecimento da cultura de chá nos Açores tornou-se

uma actividade importante quer para a região quer a nível europeu, tal facto foi noticiado no jornal “The New York Time”, a 27 de Julho de 1879, (<http://query.nytimes.com/mem/archive-ree/pdf?res=F70C12FD345B137B93C5AB178CD85F4D8784F9>).

José do Canto, em 1891, montou na sua propriedade da Caldeira Velha, Concelho da Ribeira Grande, algumas máquinas para o fabrico do chá (Pacheco, 2005). Francisco Maria Supico em 1903 elencava, para além de outros cultivadores e preparadores de chá, dez produtores em grande escala: Herdeiros de José do Canto [Caldeira Velha, Conceição, Ribeira Grande]; Luís Ataíde Corte Real da Silveira Estrela [Fábrica Corte Real, depois Mafoma, Ribeira Seca, Ribeira Grande]; Francisco de Bettencourt [Fenais da Ajuda, Ribeira Grande]; Marquês de Jácome Correia [Ribeirinha, Ribeira Grande]; José Maria Raposo de Amaral [Sete Cidades, Ponta Delgada]; Dr. Manuel Maria da Rosa [Chá Flor da Rosa, Arrifes]; Frederico Augusto Serpa [Ribeira Seca, Ribeira Grande]; Augusto Ataíde Corte Real [Charco, Rabo de Peixe]; Visconde Faria e Maia [Cabouco, Lagoa]; José Bem Saúde [Ponta Delgada] (Supico, 1903). Nesta lista não aparece mencionada a Fábrica da Gorreana, ao que parece a laborar desde 1883 (CMRG, 2012).

No início do século XX, surgiram as Fábricas de Chá Barrosa na Ribeira Seca e a do Porto Formoso em Porto Formoso. Chegaram a existir em São Miguel algumas dezenas de pequenos produtores e seis fábricas de alguma dimensão: Chá Barrosa, Chá Bensaúde, Chá Canto, Chá Corte-Real (Mafoma), Chá Gorreana e Chá Porto Formoso (CMRG, 2012; Pacheco, 2005). O chá de Moçambique, na década de cinquenta, viria a perturbar a produção do chá micalense (CMRG, 2012). O proteccionismo, oferecido pelo Estado Novo ao chá oriundo de África, sobrecarregava de taxas o chá micalense, o que entre outros factores levou ao encerramento sucessivo das várias fábricas da ilha, acabando por só sobreviver o Chá Gorreana (Sousa, 2012). As plantações de chá foram progressivamente substituídas por pastagens. Mesmo no final do século XX, em 1998, assistiu-se ao relançamento do chá Porto Formoso, com a reabertura da fábrica a 30 de Março de 2001 e em actividade desde então (Pacheco, 2005).

A análise a uma amostra de chá preto, realizada por M. Schutzenberger, professor do Colégio de França revelou qualidades de um excelente chá, bem como um óptimo sabor. Segundo análises realizadas em 1879, este chá apresentava 4,2% de teína enquanto a maioria dos chás comercializados não tinham mais de 2 ou 3% deste composto (Arquivo Digital, sd). Num estudo mais recente foi feita a determinação quantitativa dos derivados de epicatequina total e de galato de epigallocatequina (EGCG) de diferentes chás verdes, incluindo o chá verde dos Açores. Verificou-se que as concentrações de EGCG e de cafeína do chá verde dos Açores eram altas por comparação com os outros chás analisados. O aroma de diferentes amostras de chá verde foi comparado através do método de microextração em fase sólida (SPME) associado à cromatografia gasosa e espectrometria de massa. O chá verde dos Açores (*Gorreana*) apresentou a maior concentração de linalol, óxido de linalol I, óxido de linalol II, 1-penteno-3-one, (E)-2-pentenol, (E)-3-hexanol, (E, Z)-2-4-heptadienal e 3,7-dimetil-1,5,7-octatrieno-3-ol e a menor concentração de álcool benzílico, de entre os diversos chás testados, o que contribui certamente para o aroma floral e frutado intenso, típico deste chá dos Açores (Baptista *et al.*, 1999).

1.2.1 - Chá Gorreana

A plantação da *Gorreana* está situada perto da aldeia da Maia, entre a Ribeira Grande e as Furnas, na ilha de São Miguel e iniciou a sua produção em 1874. O solo argiloso e ácido dos terrenos açorianos permitem a obtenção de um chá perfumado e de travo agradável, isento de pesticidas, herbicidas e

fungicidas. O chá *Gorreana* é produzido segundo o método Hysson, através de vapor, sendo considerado um chá tradicional. As folhas são enroladas e depois secas. É produzido chá preto (totalmente fermentado), chá verde (não fermentado) e chá oolong (semi-fermentado). A produção e fabrico do chá *Gorreana*, plantação, colheita, secagem e tratamento, decorrem num único local. A área de plantação é de 23 hectares, suficientes para produzir cerca de 40 toneladas por ano.

Em 1883 foi produzido o primeiro quilo de chá *Gorreana* seco. Jaime Hintze é reconhecidamente o responsável pelo crescimento da plantação *Gorreana* sendo também o primeiro fabricante da ilha a conseguir ter a marca registada em pacotes. No início do século XX a produção anual de chá *Gorreana* atingia as 700 toneladas, mas as restrições às exportações, durante as duas guerras mundiais, levaram a que os investimentos fossem desviados para culturas mais úteis à subsistência, originando o declínio da produção de chá. No final dos anos 80 do século XX, a *Gorreana* era a única fábrica de chá europeia e até 1976 vendia cerca de 80 toneladas por ano. Quando a empresa que fazia a distribuição do produto fechou, o chá *Gorreana* deixou de estar presente de forma representativa no mercado continental. Com o surgimento das grandes superfícies comerciais as vendas baixaram bastante, mas depois recuperaram para os mesmos níveis, que hoje em dia rondam as 33 toneladas por ano. A maior parte da produção é para consumo nos Açores, mas são de destacar as 4 toneladas que por ano são exportadas para a Alemanha. Para Portugal continental são vendidas cerca de 2 toneladas e cerca de cinco por cento das vendas são efectuadas na própria fábrica. (http://www.geocaching.com/seek/cache_details.aspx?guid=eaec6e11-8408-42fb-86f3-5397b12faa62).

A *Gorreana* produz três tipos de chá preto: o *Orange Pekoe*, proveniente da primeira e por vezes da segunda folha de dentro do rebento, que é muito leve e aromático, o *Pekoe*, obtido a partir das folhas do meio, mais forte e menos aromático e, ainda o *Broken Leaf* que, por ser feito com as folhas exteriores, mais velhas, partidas em vez de enroladas, é mais fraco, menos aromático e mais barato do que os outros. Os habitantes da ilha preferem a *Moinha*, nome que se dá ao chá proveniente das pontas das folhas melhores, que se vão partindo durante o processo de tratamento, e que produz uma infusão com um sabor muito forte. Já a preparação do chá verde *Hysson* é diferente, pois utiliza vapor de água na etapa de secagem e não é fermentado como qualquer chá verde.

1.2.2 - Chá Barrosa

A empresa Chá da Barrosa Limitada tem a sua produção localizada na Mafoma, freguesia da Ribeira Seca, concelho da Ribeira Grande. O chá preto, que produziu em 1932, apresentava a seguinte composição: água 8,98%; matérias minerais (cinzas) 5,94%; cinzas insolúveis 2,52%; extracto aquoso, 29,40%; cafeína, 2,96%; azoto total 2,80%; celulose 8,20%; tanino 6,34 % (IST, 1932). Nesse mesmo ano, a empresa registou as marcas *Chá Família* e *Chá Barrosa*. Esta última marca recebeu a medalha de ouro na Exposição de Sevilha em 1929/1930 e o *Grand Prix* na Exposição de Lisboa em 1932. Em 15 de Fevereiro de 1981 ainda se publicitavam as qualidades do chá da Barrosa – *Moinha Preta*, *Popular*, *Família*, *Barrosa*, *Lata Barrosa Extra*, *Carão Barrosa Extra*, *Verde*, com os preços para o comércio e para o público. Produziam-se, então, chá preto, verde e branco (Dias, sd).

Dificuldades crescentes, como a falta de mercados e a subida acelerada das taxas de juro (6% em 1969 e mais de 32% em 1982) dificultaram a vida ao proprietário. O decreto regional nº 27/82/A de 3 de Setembro, com vista ao saneamento económico-financeiro de empresas de interesse regional, não foi suficiente para manter em funcionamento esta estrutura industrial. Aliás, no programa do Segundo Governo Regional o interesse pelo chá desaparecera. A antiga fábrica de chá da Mafoma, que havia laborado até 1974, recebia um subsídio para se transformar em espaço museológico em 1983. A firma

Amâncio Faria e Maia e Herdeiros encerrava em 1984, a Barrosa mudava de proprietário, mas a Gorreana mantinha-se apesar dos graves problemas financeiros. Em 1988, um incêndio consumiu a fábrica Barrosa, e o seu proprietário transformou os terrenos de cultura em pastos (Dias, sd).

1.2.3 - Chá Porto Formoso

A fábrica de *Chá Porto Formoso* tem a sua plantação na costa norte da ilha de São Miguel. Esta fábrica foi fundada por Amâncio Machado Faria e Maia e laborou entre os anos vinte e os anos oitenta do século XX. Em 1998 os actuais proprietários iniciaram as obras de recuperação da fábrica, Património Industrial da Região. A fábrica foi reaberta em 30 de Março de 2001 e reinicia a produção de chá preto do tipo *Orange Pekoe, Pekoe e Broken Leaf* (Pacheco, 2005).

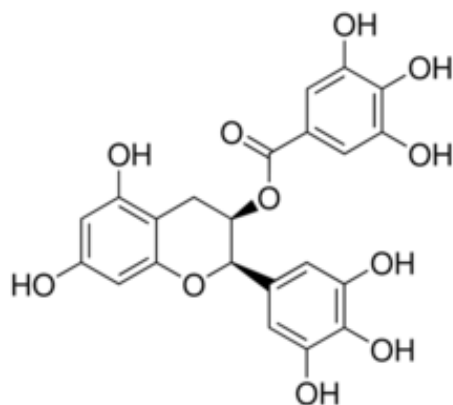
1.3 - O chá como alimento

Sabe-se hoje que, além dos nutrientes, os alimentos possuem substâncias bioativas e fitoquímicas, isto é, substâncias capazes de promover e proteger a saúde (Tabela 1.2). O consumo de substâncias bioativas parece contribuir para a prevenção e controlo de doenças degenerativas e crónicas (cancro e problemas cardiovasculares, entre outras), para o combate dos efeitos indesejáveis da menopausa e do envelhecimento precoce e para o fortalecimento do sistema imunitário (Galisa *et al.*, 2008).

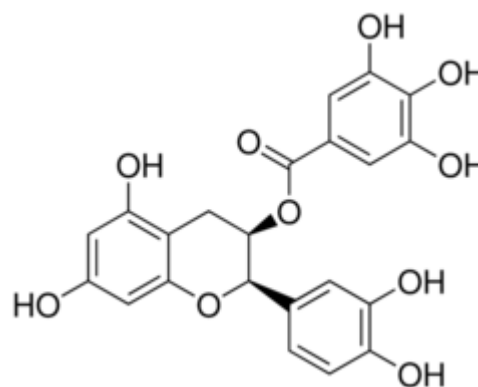
Tabela 1. 2 – Alimentos com substâncias bioativas e efeitos prováveis no organismo (Galisa et al., 2008)

| Alimento | Substâncias Bioativas | Efeitos Prováveis no Organismo |
|--|---|--|
| Peixe de água fria (salmão, atum), óleos de peixe | Ácidos gordos polinsaturados - Omega 3 | Reduzem o risco para doenças cardiovasculares e cancerígenas. Controlam a tensão. Actuam sobre os níveis do colesterol e triglicéridos |
| Lacticínios fermentados (iogurtes) | Bifidobactérias, peptídeos (prebióticos, probióticos) | Contribuem para a saúde do trato gastrointestinal. Reduzem o risco de cancro do cólon |
| Aveia, fruta e legumes | Fibras solúveis (pectinas, hemicelulose) | Mantém a regularidade intestinal. Reduzem a taxa de colesterol e LDL |
| Grãos integrais e farelos (trigo e arroz) | Fibras insolúveis (lignina, celulose) | Regulam o peristaltismo intestinal. Reduzem o risco de cancro colo-rectal e gástrico. |
| Vegetais crucíferos (repolho, couve, bróculos, couve-flor) | Glicosinolatos, compostos sulfurados) | Possuem propriedades anticarcinogénicas. Previnem o cancro da mama. |
| Frutas e vegetais amarelos intensos (cenoura, abóbora e mamão) | Carotenóides | Previnem as doenças cardiovasculares e cancro. Protegem a visão. |
| Tomate | Licopeno (carotenoides) | Reduz o risco de cancro na próstata |
| Frutos vermelhos amora, jabuticaba, uva, cereja) | Flavonóides, antocianinas | Reduzem o risco de cancro. Possuem acção antiinflamatória |
| Frutas cítricas | Vitaminas | Anticancerígeno. Reforçam o sistema imunitário. |
| Soja e produtos (“leite”, tofu, proteína texturizada) | Isoflavonas (genisteína, daidzeína) | Menor incidência dos efeitos indesejáveis da menopausa, de osteoporose e cancro estrógeno dependente (mama, ovário e útero). |
| Alho e cebola | Compostos sulfurados (ajoeno, alicina, etc) | Anticolesterolemia, anti-hipertensivo, anticancerígeno |
| Óleos vegetais (milho, girassol, gergelim) | Ácidos gordos - Ómega 6 | Reduzem o risco para doenças cardiovasculares (efeito aterogénico). |
| Azeite | Ácidos gordos monoinsaturados | Protege contra o cancro (mama e próstata). Efeito aterogénico. |
| Chá verde | Polifenóis (catequinas) | Previne o cancro e as doenças de coração. |
| Uvas tintas/vinho tinto | Compostos fenólicos (flavonóis, antocianinas) | Moderado uso de vinho.Reduzem o risco de doenças cardiovasculares e cancro. |
| Ervas | Diversos | Acção antiinflamatória e anticancerígena |
| Linhaça | Lignanos | Reduz a probabilidades de cancro induzida pela hormona estrogénio. |

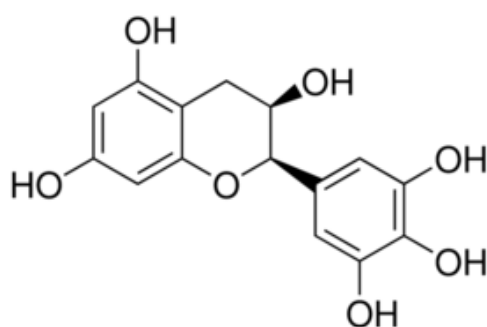
Os alimentos com actividade biológica podem ser de origem animal, como é o caso dos lacticínios, ou os peixes gordos e, neste caso os componentes activos são sobretudo de natureza proteica ou lipídica; exemplos destes componentes funcionais são os peptídeos bioactivos encontrados nos produtos lácteos ou os ácidos gordos polinsaturados que abundam em peixes como o salmão ou a sardinha. Os alimentos funcionais de origem vegetal apresentam componentes funcionais que incluem compostos sulfurados, compostos fenólicos, vitaminas e carotenóides. No caso do chá verde são os compostos fenólicos os componentes nutraceuticos mais abundantes e os principais responsáveis pela sua actividade biológica (Figura 1.1). O chá é uma boa fonte alimentar de catequinas (Khan *et al.*, 2007)



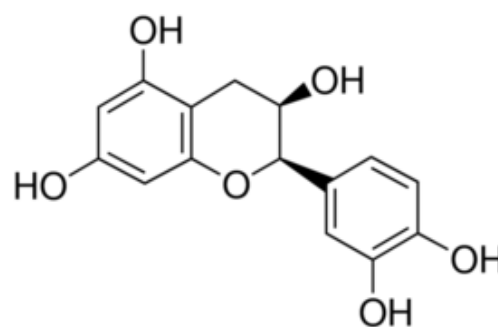
(-)-Epigallocatequina-3-galato



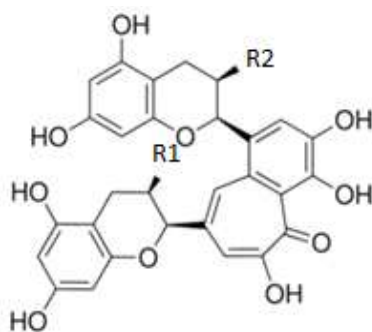
(-)-Epicatequina-3-galato



(-)-Epigallocatequina



(-)-Epicatequina

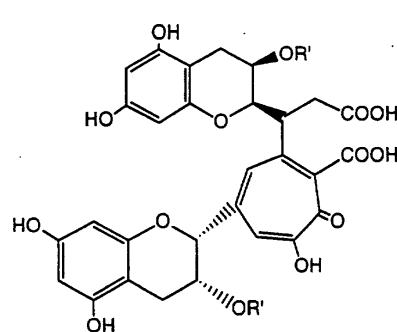


Teoflavina [TF1]: $R_1 = R_2 = OH$

Teoflavina-3-galato [TF₂A]: $R_1 = \text{Galoil}; R_2 = OH$

Teoflavina-3'-galato [TF₂B]: $R_1 = OH; R_2 = \text{Galoil}$

Teoflavina-3,3'-galato [TF₃]: $R_1 = R_2 = \text{Galoil}$



(R=Galoil ou outros grupos)

Teorrubiginas

Figura 1.1 - Estrutura dos polifenóis mais abundantes do chá (Khan *et al.*, 2007)

O galato de epigallocatequina (EGCG) é a principal catequina e pode ser responsável por 50-80% do total de catequina em chá (Khan *et al.*, 2007) e por mais de 10% numa base de peso seco (Dufresne *et al.*, 2001). No entanto, a catequina (C) e epicatequina (EC) também podem ser encontrados no chocolate, uvas pretas, vinho tinto e maçãs (Dufresne *et al.*, 2001; Galisa *et al.*, 2008). Os flavonóis são mais amplamente distribuídos, estando presentes na cebola, chicória, vegetais crucíferos, uvas pretas, vinho tinto, toranjas, de maçãs, cerejas e frutos vermelhos, amora, jabuticaba, uva, cerveja (Dufresne *et al.*, 2001; Galisa *et al.*, 2008). Quercetina, campferol e rutina são os flavonóis mais importantes no chá (Dufresne *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2007).

O chá contém ácidos fenólicos, principalmente, cafeico, quínico e ácidos biliares. O ácido cafeico também é encontrado em uvas brancas, frutas vermelhas, na maioria das frutas, em alguns vegetais e particularmente em azeite, espargos e repolho (Dufresne *et al.*, 2001). O chá é também uma boa fonte de metilxantinas principalmente sob a forma de cafeína (Dufresne *et al.*, 2001; Horzić *et al.*, 2009). Contém cerca de um terço da cafeína do café, a fonte mais conhecida de cafeína. A teanina é um aminoácido encontrado somente em folhas de chá. Foram estudados cerca de 20 aminoácidos existentes no chá (Liang *et al.*, 2001; Nie *et al.*, 2008). O chá contém óleos voláteis (responsáveis pelo aroma e sabor), vitaminas (A, B1, B2, C, E, K, P e PP), minerais (essencialmente, cálcio, potássio, magnésio, fósforo e flúor), fibras (26 %), os aminoácidos livres (4%) e glícidos (7%), purinas, polifenóis (80%), particularmente catequinas (Ferrara *et al.*, 2001).

Uma bebida de chá típica, preparada numa proporção de 1g de chá em 100 mL de água durante 3 minutos, geralmente contém 250-350 mg de extracto seco, composto por 30-42% de catequinas e 3-6% de cafeína (Khan *et al.*, 2007). As percentagens médias aproximadas dos componentes dos extractos sólidos no chá preto são: catequinas (10-12%), teaflavinas (3-6%), tearubiginas (12-18%), flavonóis (6-8%), ácidos fenólicos (10 -12%), aminoácidos (13-15%), metilxantinas (8-11%), hidratos de carbono (15%), proteínas (1%), a matéria mineral (10%), e compostos voláteis (<0,1%) (Khan *et al.*, 2007).

O valor calórico do chá é pouco significativo, e os componentes determinados para os chás (preto, verde e de ervas) com valores diferentes de zero para pelo menos um dos chás, como se pode verificar na tabela das bebidas não alcoólicas (Tabela 1.3) elaborada pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Porto & Oliveira, 2006).

Tabela 1. 3 - Tabela de Composição do chá (Porto & Oliveira, 2006)

| | | | Macroconstituintes | | | | | Vitaminas | | | | | Minerais | | | | | | |
|--------------|------------------------------------|------|--------------------|----------|----------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------|-------------------------|-------|-----|---------|----------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| | Energia | | Água | Proteína | Total HC disponíveis | Total HC expresso em monossacáridos | Mono + dissacáridos | Riboflavina | Equivalentes de niacina | B6 | C | Folatos | Cinza | Na | K | Ca | P | Mg | Zn |
| | (kcal) | (kJ) | (g) | | | | | (mg) | | | | | (mg) | | | | | | |
| Chá, infusão | Valores por 100 ml de parte edível | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Preto | 0 | 2 | 99.8 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0.017 | 0.10 | 0.005 | 0 | 3.0 | 0.04 | 2.0 | 11 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.1 |
| Verde | 0 | 2 | 99.7 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 0.020 | 0.10 | 0.005 | 3.0 | 0.05 | 0.03 | 2.0 | 10 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 0.1 |
| De ervas | 1 | 3 | 99.7 | 0 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.0 | 0.03 | 2.0 | 10 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 0.1 |

1.3.1 - Componentes orgânicos

Muitos factores podem influenciar de forma significativa a composição do chá, como a espécie, idade da planta, estação do ano em que a folha foi colhida, o clima e as técnicas de cultura (solo, irrigação e fertilizantes) (Saito, 2006). O chá contém compostos voláteis, vitaminas, minerais, purinas e polifenóis, especialmente catequinas. Num estudo realizado com dez chás comerciais de vários países, foi determinada a sua composição mineral e o seu conteúdo de polifenóis e flavonóides tendo-se concluído que estes parâmetros apresentam variações associadas às diferentes origens das plantas (Ferrara *et al.*, 2001).

O chá verde contém maior quantidade de compostos fenólicos e flavonóides que o chá preto o que significa que o tipo de tratamento a que a planta é sujeita influencia a sua composição química. O chá verde contém componentes fenólicos que incluem catequinas, flavanóis, flavonóis e ácidos fenólicos, os quais totalizam cerca de 30% do peso seco das folhas (Lamarão & Fialho, 2009). Chen e colaboradores (2010) demonstraram que o conteúdo em galato de (-)-epigallocatequina, galato de catequina e de catequinas totais nos chás oolong, cultivados a altitudes elevadas, foram significativamente superiores aos obtidos em chás cultivados a baixa altitude. A baixa altitude obtiveram-se teores de catequinas totais e individuais no chá de outono significativamente superiores aos do chá de primavera. No entanto, a alta altitude não houve diferenças significativas nesses teores entre os chás de primavera e de outono. Foi também sugerido neste estudo que o conteúdo de (-)-epigallocatequina, galato de catequina e de catequinas totais nos chás oolong pode ser correlacionado com a pontuação de gosto e com o índice de qualidade do chá oolong (Chen *et al.*, 2010).

No chá verde estão presentes outros compostos orgânicos como a cafeína e aminoácidos. A diferença entre chá verde e chá preto depende da inactivação das enzimas foliares durante o processamento. Na fabricação do chá verde as enzimas são inactivadas imediatamente após a colheita das folhas, logo a composição de folhas no chá verde tende a ser semelhante à das folhas frescas. Na produção do chá preto as catequinas são oxidadas enzimaticamente durante o processo de fermentação gerando uma mistura complexa de polifenóis, constituída principalmente por teaflavinas, teasinensinas e tearubiginas (Lima *et al.*, 2009). Num estudo da composição de infusões de *Camellia sinensis* (Liang *et al.*, 2001) foram detectados dezasseis aminoácidos. A tiamina, o ácido glutâmico e a histidina foram os aminoácidos que apresentaram concentrações mais elevadas. Os polifenóis detectados no mesmo estudo foram a catequina, a epicatequina, o galato de epicatequina, o galato de catequina, a rutina, a mericitina e a quercetina. Num outro estudo da composição de folhas chá foram identificados dezoito aminoácidos (Nie *et al.*, 2008).

A composição de compostos fenólicos e metilxantinas e a capacidade antioxidante de chás branco, verde, oolong e preto e de infusões de camomila e tília, foram determinadas por Horžić e colaboradores (2009), em função das condições de extracção (temperatura da água e extracções múltiplas). O maior teor de compostos fenólicos foi encontrado no chá verde e o menor teor nas infusões de plantas. O maior teor de cafeína (uma metilxantina) foi obtido para o chá preto. Verificou-se ainda que a extracção a 100°C é a que permite atingir o maior teor de polifenóis e metilxantinas, em todos os chás estudados (Horžić *et al.*, 2009). Noutro estudo, foi verificado que os teores de fenóis totais e de flavonóides aumentaram com o tempo de aquecimento da infusão, e variaram significativamente entre as amostras de chá verde e de chá preto (Pereira *et al.*, 2009). A eficiência máxima de extracção de catequinas com água foi obtida a 80 °C após 20 minutos (97%) e a 95 °C após 10 minutos de extracção (90%). Observou-se ainda a degradação das catequinas a temperaturas mais elevadas e com tempos de extracção mais prolongados (Perva-Uzunalić *et al.*, 2006). Chen e

colaboradores (2010) demonstraram que a técnica de *detecção electrónica de componentes em solução* com calibração multivariada, tem um potencial elevado para determinar o conteúdo das principais catequinas e de cafeína no chá verde. Este trabalho inclui muitos outros compostos químicos complexos, e além das três principais catequinas (galato de epigallocatequina, epigallocatequina e galato de epicatequina) e da cafeína, os sensores podem determinar sete gostos, podendo ser utilizados para outros compostos químicos em infusão de chá (Chen *et al.*, 2010).

A planta do chá contém componentes lipossolúveis, como o β -caroteno e a luteína (Wang *et al.*, 2010). Estes autores determinaram que o teor de β -caroteno do chá das folhas de verão e de outono era 3 a 10 vezes maior que o chá de folhas de primavera. De facto, um grande número de folhas de chá não é colhido a cada ano. No final da primavera ou início do verão, os arbustos de chá são frequentemente podados para preparar o próximo ano de produção, de forma a propiciar o crescimento de uma grande quantidade de folhas de chá e o crescimento de novas hastes. Estes materiais resultantes da poda são geralmente desperdiçados, mas dada a sua riqueza em compostos antioxidantes poderiam ser aproveitados para a produção de pó de chá e utilizados como um suplemento natural de compostos fenólicos e carotenóides em alimentos diversos. Num estudo de infusões das flores do chá foram isoladas e caracterizadas, por espectrometria de massa e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, oito catequinas e cinco flavonóides glicosilados, nomeadamente 3-O- β -D- galactopiranosídeo de miricetina, 3-O- β -D- galactopiranosídeo de quercetina, 3-O- β -D-galactopyranoside de campferol, 3-O- β -D-glucopiranosídeo de campferol e 3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosídeo] de campferol (Yang *et al.*, 2009).

1.3.2 - Componentes inorgânicos

O chá é uma bebida popular em todo mundo e o seu conteúdo mineral pode ser visto como um contributo importante para o seu valor nutricional mas, por outro lado, a eventual contaminação de folhas de chá por metais pesados pode representar uma séria ameaça para a saúde humana.

O conteúdo mineral de 9 infusões e 1 chá (hortelã-pimenta, *Echinacea*, trevo vermelho, ginseng siberiano, folhas de dente-de-leão, folhas de framboesa vermelha, folhas de mirtilo e chá verde) foi avaliado por espectrofotometria de absorção atómica (Gallaher *et al.*, 2006). Verificou-se que nenhuma das infusões apresentou teores elevados de cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P), potássio (K), sódio (Na), cobre (Cu), ferro (Fe), manganésio (Mn), ou zinco (Zn). Foram também determinadas nas infusões referidas, excluindo a do ginseng siberiano, as taxas de extracção para os seguintes metais: K (71%), P (43%), Mg (38%), Na (34%), Ca (18%), Cu (33%), Fe (6%), Mn (24%) e Zn (35%). Os níveis de potássio foram particularmente altos em duas das infusões (folhas de dente-de-leão e *Echinacea*), correspondendo 3 a 5 chávenas destas infusões a 10% do valor diário recomendado de potássio. Estas infusões apresentaram baixos teores de sódio, podendo ser rotuladas como “com muito baixo teor de sódio” (35 mg de sódio ou menos/236 ml) e ser incluídas em dietas de baixo teor em sódio (Gallaher *et al.*, 2006). Um outro estudo sugere que o chá é uma boa fonte de manganês e contribui para a ingestão de cobre, não apresentando níveis de alumínio que sejam tóxicos para indivíduos saudáveis (Mehra & Baker, 2007). Num outro estudo, realizado com o objectivo de avaliar as concentrações de flúor (F) e alumínio (Al), em infusões de ervas, chá preto e bebidas à base de chá, provenientes do Brasil, foram analisadas 177 amostras de infusões de ervas e de chá preto, 21 amostras de bebidas à base de chá e ainda 11 tipos de chá preto importados. Verificou-se que a quantidade de flúor e alumínio encontrada nas infusões de ervas foi muito baixa, mas foi alta nos chás pretos e nas bebidas à base de chá. A quantidade de alumínio em todas amostras analisadas pode ser considerada

segura para a saúde. No entanto, considerando 0,07 mg F/kg/dia como o limite superior a partir do qual aumenta o risco de fluorose, verificou-se que alguns chás pretos e algumas bebidas à base de chá contêm concentrações de flúor suficientes para submeter crianças a uma dose diária superior ao limite. Por este facto, considerou-se que os chás pretos brasileiros e importados, assim como as bebidas à base de chá são fontes de quantidades significativas de flúor e a sua ingestão diária pode aumentar o risco de fluorose dental (Hayacibara *et al.*, 2004).

Ansari e colaboradores (2007) determinaram as concentrações dos metais pesados Cd, Pb, Ni e Al e dos macro-elementos Fe, Zn, Cu e Mn por espectrofotometria de absorção atómica, em 30 amostras de chá preto cultivado no Irão e em 30 amostras de chá preto importado por este país. Os resultados da análise mostraram que o nível médio de Al foi de $699,2 \pm 172,7$ mg/kg no chá iraniano e de $388,3 \pm 98,3$ mg/kg no chá preto importado. Os elementos Cd, Pb e Ni não foram detectados. O macro-elemento mais abundante foi o manganês que variou nas gamas de 155,2-214,2 mg/kg e de 96,7-332,9 mg/kg no chá do Irão e nos chás pretos importados, respectivamente (Ansari *et al.*, 2007).

Os teores de metais essenciais, não-essenciais e tóxicos, foram analisados por Yemane e colaboradores (2008), em cinco variedades de *Camellia sinensis* L. e no solo da propriedade onde são produzidas, na Etiópia. Foram determinados por espectrofotometria de absorção atómica o potássio, o cálcio, o magnésio, o ferro, o manganês, o cobre, o zinco, o sódio, o chumbo e o cádmio. Verificou-se que o macronutriente potássio foi o elemento mais abundante nas folhas de chá (17,7-24,8 mg/g), apresentando no solo uma concentração de 7,14-9,73 mg/g. O micronutriente manganês foi o metal predominante nos tecidos de folhas de chá variando a sua concentração entre 501 e 1281 mg/kg. O ferro foi o segundo micronutriente mais abundante (29,6-100 mg/kg) estando presente no tecido foliar numa concentração próxima do manganês. As concentrações de cobre e cobalto (Co) foram relativamente baixas tanto no solo como nas amostras de chá. Os metais pesados tóxicos chumbo e cádmio não foram detectados pela técnica analítica utilizada. Os solos foram considerados ácidos (pH 5,04-5,49) com matéria orgânica alta (5,48-6,02%). Em geral, nos solos estudados, os níveis da maioria dos metais, especialmente os macronutrientes, têm correlações positivas com os níveis encontrados nas folhas de chá (Yemane *et al.*, 2008). Noutro estudo, verificou-se que a correcção da acidez dos solos onde crescem as plantas de chá, é uma forma eficaz para reduzir a contaminação de Pb no chá (Han, 2007). De facto, fez-se o estudo com plantas cultivadas em vasos, com solos de pH fortemente ácido (3,6), e adicionou-se carbonato de cálcio (CaCO_3) de forma a aumentar pelo menos de 1 unidade o pH do solo. Este aumento do pH reduziu significativamente as concentrações de Pb das raízes finas, caules e brotos de plantas de chá, provavelmente por favorecer as interacções deste elemento com outros componentes do solo e assim diminuir a sua absorção pela planta do chá. Quando o estudo se realizou em campo aberto este efeito não foi tão significativo durante o primeiro ano após a aplicação do CaCO_3 , mas tornou-se importante durante o segundo e terceiro anos em que a concentração de Pb na parte aérea nas novas plantas diminuiu cerca de 20-50% (Han *et al.*, 2007).

Num estudo realizado por Yuan e colaboradores (2007) sobre o teor de arsénio (As), em diversos chás oriundos da China, foi testada a presença deste elemento, em diferentes condições de infusão, nomeadamente, fazendo variar o tempo e a temperatura de infusão. O arsénio detectado no chá aparece como arsénio inorgânico, essencialmente sob a forma de arsenito (As(III)) e arseniato (As(V)), embora nas folhas de chá original apareça também sob a forma orgânica. O conteúdo de arsénio inorgânico encontrado nas folhas de chá foi de 226 ng/g (Yuan *et al.*, (2007). Assumindo que uma pessoa, de 60 kg de peso corporal, consome 10 g de chá chinês por dia, a contribuição máxima de arsénico inorgânico é de 2,26 µg por infusão de chá, ou seja, representa 0,038 µg/kg/d excluindo a contribuição da água. Este valor representa 1,8% da ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) de 2,1 µg/kg/d

recomendado (FAO/WHO, 1989). Para aumentar e garantir a segurança dos produtores e dos consumidores de chá, relativa à produção de chá de alta qualidade, foi ainda efectuado um estudo para a análise e verificação do país de origem da plantação de chá. A análise de amostras de chá oriundas da Ásia foi feita usando técnicas de identificação de isótopos de origem orgânica e inorgânica. Utilizaram-se as seguintes variáveis ^{13}C , ^{49}Ti , ^{53}Cr , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{65}Cu , ^{71}Ga , ^{85}Rb , ^{88}Sr , ^{89}Y , ^{93}Nb , ^{111}Cd , ^{133}Cs , ^{138}Ba , ^{139}La , ^{140}Ce , ^{141}Pr , ^{153}Eu , ^{203}Tl , ^{208}Pb e ^{209}Bi . A aplicação da análise discriminante linear, ou de Fisher, das razões entre isótopos e das concentrações de minerais permite obter uma classificação correcta de 97,6% das amostras de chá (Pilgrim, 2010).

1.4 - Efeito biológico do chá

O chá é considerado uma bebida saudável, fonte de moléculas farmacologicamente activas e com propriedades medicinais desde tempos bem remotos. Como já foi referido anteriormente, o chá é uma fonte de polifenóis e flavonóides, antioxidantes encontrados por todo o reino vegetal, e que conferem a esta bebida o leve sabor adstringente característico. As folhas de chá frescas contêm quatro catequinas principais: a epicatequina (EC), o galato de epicatequina (ECG), a epigallocatequina (EGC) e o galato de epigallocatequina (EGCG), compostos solúveis em água, e que portanto se encontram também em quantidade importante nas infusões de chá verde. As observações epidemiológicas e estudos de laboratório indicam que os polifenóis do chá agem como antioxidantes *in vitro* eliminando espécies reactivas de oxigénio ou de azoto e efectuando a quelação de iões metálicos; estas propriedades sugerem portanto que o consumo de chá poderá reduzir o perigo/risco de uma variedade de doenças associadas ao stresse oxidativo, incluindo o cancro e as doenças coronárias. O chá é também uma bebida tradicionalmente conhecida pelas propriedades digestivas, excitantes e diuréticas, mas que não se deve tomar em excesso pois pode causar perturbações no sistema nervoso (Séguier, 2001).

A acção antioxidante dos polifenóis do chá tem despertado também o interesse do uso do chá, como possível aditivo natural, pela indústria alimentar, para substituição de antioxidantes sintéticos. Os polifenóis do chá verde são utilizados nos géneros alimentícios, com um alto conteúdo de água ou em produtos cozidos, devido à sua solubilidade em água e resistência à degradação por acção do calor. Os extractos de chá verde fornecem uma protecção altamente eficaz, contra a oxidação de emulsões de óleo em água, a pH 5,5 e na ausência de iões férricos, durante longos períodos de armazenamento. Incorporados em sumos ou outros alimentos podem melhorar a qualidade do produto e justificar a designação de alimentos funcionais. Os extractos de chá são adicionados à goma de mascar e a rebuçados para reduzir a ocorrência de cáries e suavizar o hálito de alho, peixe (trimetilamina), metanotiol, amónia e cheiro a tabaco. A L-tianina pode ser adicionada a bebidas, biscoitos, doces ou sorvetes produzindo um efeito relaxante e pode mascarar o sabor amargo em alguns alimentos. A definição de regulamentação adequada ajudará a indústria a estabelecer níveis de suplementação que poderá ser benéfica e segura para os consumidores (Dufresne, 2001).

Nos últimos anos a investigação centrou-se no papel dos oxidantes/antioxidantes em relação ao processo de envelhecimento e doenças degenerativas. Os levantamentos epidemiológicos, embora nem sempre conclusivos, têm associado o consumo de chá com a redução do risco de doenças cardiovasculares e cancro, enquanto os estudos em culturas de células e modelos animais indicam um potencial efeito benéfico do chá na inibição das enzimas da Fase I e II da carcinogénese. Vários factores afectam directamente a farmacocinética e concentração final de polifenóis nos tecidos, tais como o tipo de chá (verde, oolong e preto), a preparação (por exemplo, o tempo e a temperatura de

infusão) e a frequência de ingestão do chá (Khan *et al.*, 2007). Alguns estudos sugerem que o chá verde tem efeito protector contra diversos tipos de cancro e doenças cardiovasculares, e que possui propriedades antialérgicas, antiescleróticas e antibacterianas, além de ser rico em minerais e vitamina K (Koo & Cho, 2004; Lima *et al.*, 2009). Outros trabalhos indicam ainda que o chá verde e/ou seus compostos bioactivos, nomeadamente o galato de epigallocatequina, têm efeitos anti-obesidade (Lamarão & Fialho, 2009) e que o galato de epigallocatequina poderia ter um efeito anti-HIV (Saito *et al.*, 2006). Noutro estudo ainda, o chá verde activou antioxidantes intracelulares, inibindo a formação de iniciadores da carcinogénese, suprimindo a angiogénese e a proliferação das células cancerosas no trato gastrointestinal (Pastore *et al.*, 2006).

O chá preto tem um efeito de sequestração dos radicais livres, é um potencial anticarcinogénico e antimutagénico e tem capacidade para reduzir o perigo/risco de doenças cardiovasculares, devido à presença de catequinas (Lima *et al.*, 2009). Estudos recentes têm demonstrado que o consumo de chá verde e preto pode diminuir o colesterol sérico em animais e no homem, e é sugerido que será a supressão da síntese de colesterol hepático a contribuir para este efeito (Singh & Banerjee & Porter, 2009). Faria e colaboradores (2006) avaliaram a existência de correlações entre o consumo de chá de *Camellia sinensis* e a prevenção de doenças cardiovasculares. O estudo recaiu sobre um grupo de trinta e quatro indivíduos entre os 25 e os 84 anos, de ambos os sexos, pertencentes à comunidade nipónica do Rio de Janeiro, 76% dos quais consumiam chá verde, 35% diariamente e 27% esporadicamente. Havia um consumo regular de álcool, predominantemente nos não consumidores de chá verde, quando comparados com os apreciadores da bebida (50% e 35%, respectivamente, faziam uso de álcool). Verificou-se que dos apreciadores do chá, 81% não apresentavam doenças crónicas, especialmente hipertensão (Faria *et al.*, 2006). Outros estudos revelaram que os compostos flavonóides do chá, para além das propriedades antioxidantes, têm muitos outros efeitos benéficos. Os flavonóides do chá podem reduzir a inflamação, ter efeitos antimicrobianos, prevenir a cárie dentária e reduzir a absorção de lípidos - colesterol (Koo & Cho, 2004). O consumo de chá pode ter um efeito diurético devido à cafeína. Foi encontrado um composto no chá relacionado com a cafeína, a teofilina, que é um medicamento licenciado para o tratamento de doenças respiratórias como a asma (Sharangi, 2009).

1.4.1 - Actividade antioxidante

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas à de um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato (Percival, 1998; Young & Woodside, 2001 in Atoui *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Atoui e colaboradores (2005) permitiu identificar e avaliar a actividade antioxidante, de cerca de 60 diferentes flavonóides, ácidos fenólicos e seus derivados por dois métodos, DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ensaios de quimioluminescência (Atoui *et al.*, 2005). Num estudo efectuado para determinar a capacidade antioxidante dos chás branco, verde, oolong e preto e de infusões de camomila e tília, variando as condições de extracção (temperatura da água e extracções múltiplas), verificou-se que o chá verde e as infusões de plantas apresentavam, respectivamente, a maior e a menor capacidade antioxidante (Horžić *et al.*, 2009).

O chá contém polissacáridos naturais, que não existem sempre de forma isolada nas plantas, nomeadamente nas plantas do chá, e que se encontram ligados a outros componentes, tais como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, etc. A actividade biológica destes polissacáridos e seus conjugados pode ser afectada por muitos factores, incluindo componentes químicos, massa molecular, estrutura de conformação e até a extracção e métodos de isolamento. Os resultados de um estudo realizado por Chen e a sua equipa sugerem assim que os pesos moleculares dos polissacarídeos do chá

podem influenciar de forma importante na sua bioactividade, nomeadamente na actividade antioxidante (Chen *et al.*, 2008).

O chá pode ser usado como um aditivo antioxidante em produtos alimentares ricos em lípidos inibindo a oxidação de gorduras e contribuindo assim para controlar a lipoperoxidação, embora ainda não esteja completamente esclarecido o mecanismo desta acção (Gramza & Korczak, 2005). No chá preto são também os polifenóis, como as teaflavinas, as tearubiginas e as catequinas, que são geralmente considerados os principais responsáveis pelas acções antioxidantes, nomeadamente a sua capacidade de reagir com radicais livres e quelar os iões metálicos de transição. O chá preto, bem como as teaflavinas individualmente, podem influenciar a activação de factores de transcrição como NF κ B ou AP-1. As teaflavinas foram também capazes de inibir a actividade de enzimas pro-oxidativas, como a oxidase da xantina ou a sintase do óxido nítrico. O chá preto pode ser então considerado como um agente antioxidante, disponível na vida quotidiana (Luczaj & Skrzydlewska, 2005). Um estudo, que utilizou as flores de chá (*Camellia sinensis*), permitiu verificar que os compostos presentes no extracto etanólico e na fracção solúvel em acetato de etilo (catequinas e flavonóides glicosilados) tinham capacidade de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) em concentrações relativamente elevadas (Yang, 2009).

1.4.2 - Actividade antimicrobiana

Os polifenóis do chá, especialmente as catequinas, são potentes agentes antimicrobianos. Verificou-se que os compostos fenólicos formados durante a fermentação do extracto de chá Pu-erh podem contribuir para a actividade antimicrobiana do extracto (Wu *et al.*, 2007). Almajano e colaboradores (2008) verificaram que a actividade antimicrobiana do chá não fermentado é superior à do chá semi-fermentado ou fermentado e que a maior actividade antimicrobiana ocorre em amostras que apresentam também maior concentração de polifenóis totais e maior actividade antioxidante (Almajano *et al.*, 2008). Assim, os chás brancos e verdes poderão ser boas fontes de extractos com capacidade de inibição microbiológica. A utilização destes chás, em combinação com outros aditivos antimicrobianos ou métodos de estabilização de produtos alimentares, poderá representar uma forma alternativa de manter a segurança alimentar e uma boa qualidade organoléptica, sem recorrer a conservantes sintéticos convencionais.

Quando estes extractos são usados como aditivos alimentares é importante averiguar quais as potenciais transformações sofridas durante o seu percurso no sistema gastrointestinal pois estas podem alterar a estrutura química dos seus componentes e portanto a sua actividade biológica. Vermaak e colaboradores (2009) investigaram as actividades biológicas de extractos de plantas, que são destinados à administração oral, considerando o extracto bruto e o extracto submetido a digestão gastrointestinal simulada. Extractos de *Camellia sinensis* (chá verde) e *Salvia officinalis* (sálvia) foram incubados com fluido gástrico simulado (SGF) e fluido intestinal simulado (SIF), após o que tanto o extracto bruto como os produtos da sua digestão foram testados para a actividade antimicrobiana. Os extractos brutos de ambas as plantas apresentaram uma reduzida actividade antimicrobiana após a exposição à SGF e não foi detectada nenhuma actividade antimicrobiana após a exposição ao SIF. Estes resultados sugerem que os componentes antimicrobianos dos extractos, quando expostos às condições gastrointestinais, sofrem uma modificação química ou uma degradação (Vermaak *et al.*, 2009). Noutro estudo foram isolados, a partir das folhas de chá da *Camellia sinensis*, compostos bioactivos, nomeadamente a cafeína (3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona), e testou-se a sua capacidade de inibir o crescimento de seis bactérias patogénicas: duas bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e quatro bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*,

Proteus mirabilis, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*). Neste estudo concluiu-se que a cafeína é um potencial agente natural, com capacidade antimicrobiana contra diferentes bactérias e, portanto, poderia ser usada como um conservante natural para controlar o seu crescimento, uma vez que as concentrações de cafeína encontradas no chá verde são suficientes para justificar a acção antibacteriana contra as bactérias testadas (Mohammed & Al-Bayati, 2009).

1.4.3 - Actividade antimutagénica e antiproliferativa

Componentes da dieta que são capazes de inibir o crescimento de células cancerosas, sem afectar o crescimento de células normais, são alvo de uma atenção considerável no desenvolvimento de novas abordagens no tratamento do cancro. A iniciação, a promoção e a progressão de desenvolvimento de um cancro são causadas por diversos factores que estão relacionados com a genética, o metabolismo, a alimentação e o ambiente externo. A acumulação intracelular de espécies reactivas de oxigénio pode resultar em modificações na estrutura do ADN e na actividade enzimática, influenciando o desenvolvimento da patogénese do cancro. Assim, os antioxidantes, como os que são encontradas no chá, podem desempenhar um papel importante na prevenção e controlo do desenvolvimento do cancro mediante a sua acção de neutralização de espécies reactivas de oxigénio. Muitos estudos têm sido realizados com culturas de células tumorais *in vitro*, com modelos animais e, mais recentemente, em seres humanos. Uma grande ênfase tem sido dada aos mecanismos moleculares envolvidos de forma a melhor se entenderem as causas dos diversos cancros e as possíveis funções dos componentes da dieta que poderiam impedir o aparecimento do cancro (Dufresne & Farnworth, 2001).

Contudo, apesar dos estudos em modelos animais e com linhas celulares demonstrarem a actividade de diversos compostos na prevenção do cancro, os dados epidemiológicos permanecem em muitos casos não conclusivos. Esta discrepância pode resultar de vários factores que incluem o estilo de vida, a correlação entre modelos animais e humanos e as diferenças no metabolismo entre os indivíduos. Vários mecanismos, baseados nas experiências *in vitro*, têm sido propostos para explicar a actividade preventiva de alguns compostos em relação à oncogénese. A relevância de alguns desses mecanismos *in vivo* permanece por demonstrar pois a biodisponibilidade e biotransformação dos compostos polifenólicos no chá podem influenciar decisivamente o efeito destes compostos a nível celular (Lambert & Yang, 2003). Foram feitos estudos da actividade antimutagénica do extracto de chá Pu-erh cujos resultados indiciam que a actividade do extracto tem efeito inibitório sobre o potencial mutagénico por acção directa 4-nitroquinoleína e sobre o efeito mutagénico por acção indirecta da aflatoxina B1. Os autores consideram que o teor de compostos polifenólicos e compostos activos formados durante a fermentação do extracto de chá Pu-erh pode contribuir para a actividade antimutagénica deste extracto (Wu *et al.*, 2007).

Desde 1970, os estudos epidemiológicos sobre cancro têm mostrado que, em algumas partes do mundo onde o chá verde é consumido, a incidência de cancros de tumores sólidos como o da mama, pulmão e cancro gastrointestinal é inferior às outras partes do mundo. Testes das propriedades do chá verde em modelos animais (ratos) demonstraram que o chá protege contra a formação de tumores sólidos. A investigação em humanos é muito promissora no caso do chá verde como eventual tratamento para vários tipos de cancro, tendo sido comprovado laboratorialmente que o composto galato de epigallocatequina do chá verde induz a morte das células cancerosas de tumores sólidos (Pastore *et al.*, 2006). Alguns estudos epidemiológicos, que terão demonstrado o efeito protector do consumo de chá verde, sugerem que o chá verde tem efeitos benéficos sobre o cancro gastrointestinal, mama, pulmão e próstata. No entanto, estes resultados não são consistentes uma vez que os resultados não foram confirmados por outros estudos (Liu *et al.*, 2008).

1.4.4 - Outros efeitos

A osteoporose é o resultado de um desequilíbrio na relação entre a formação e a reabsorção de massa óssea. Reforçar a actividade dos osteoblastos, além de reduzir a dos osteoclastos, pode ajudar a restaurar o equilíbrio no metabolismo ósseo e limitar o desenvolvimento da osteoporose. Há indícios crescentes de que o chá verde contém muitos ingredientes bioactivos que suportam alguma protecção contra a osteoporose. Os dados epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre o consumo de chá e a prevenção de perda óssea relacionada à idade em mulheres idosas e homens. A ingestão de chá verde e dos seus compostos bioactivos podem ser benéficos para atenuar a perda óssea da população, diminuindo o risco de fracturas. O chá verde ou os seus componentes bioactivos poderão afectar (i) a prevalência e a etiologia da osteoporose; (ii) o papel do stresse oxidativo e antioxidantes na osteoporose; (iii) a osteogénese, osteoblastogénese e osteoclastogénese. Em geral, os estudos epidemiológicos em humanos e animais, bem como em culturas celulares, indiciam que o chá e seus componentes bioactivos podem diminuir o risco de fractura, por melhorar a densidade mineral óssea, apoiar as actividades osteoblásticas e suprimir as actividades osteoclásticas (Shen *et al.*, 2009).

Nos últimos anos têm havido um interesse crescente no papel do chá verde e das suas catequinas na redução dos factores de risco para a doença cardiovascular. Alguns desses factores são (a) o peso corporal, possivelmente através da interferência no sistema simpático e enzimas envolvidas na síntese de ácidos gordos; (b) a oxidação das LDL; (c) a absorção de colesterol e os seus níveis plasmáticos; (d) a expressão de moléculas de adesão celular; (e) a agregação de plaquetas e (f) a pressão sanguínea sistólica e diastólica. Os efeitos positivos do chá verde e das suas catequinas relativamente a todos estes factores de risco sugerem que a ingestão de 7 chávenas de chá verde por dia (3,5 g catequinas) é uma boa escolha para prevenir as doenças cardiovasculares (Figuerola, 2004). Estudos recentes têm demonstrado que o consumo de chá verde e de chá preto pode reduzir o colesterol sérico em animais e no homem, através da supressão da síntese hepática de colesterol. Para avaliar esta hipótese, foi medida a síntese de colesterol em células de hepatoma de rato cultivadas na presença de extractos de chá verde e preto e de alguns componentes seleccionados. Ambos os extractos inibiram directamente a actividade da enzima HMG-CoA redutase (envolvida na produção de colesterol) e aumentaram a sua inactivação através de um processo de fosforilação mediado pela enzima AMP-quinase. Verificou-se um aumento da fosforilação da HMG-CoA redutase, em cerca de 2,5 a 4 vezes, aumento esse que ocorreu de forma rápida na presença de extracto de chá verde (após cerca de 30 minutos), e mais lentamente na presença de extracto de chá preto (após pelo menos 3 horas de tratamento). Estes resultados sugerem que tanto o chá verde como o chá preto diminuem a síntese de colesterol em células inteiras directamente, inibindo a HMG-CoA redutase e promovendo a sua inactivação por AMP-quinase (Singh *et al.*, 2009).

Alguns chás chineses, verde, jasmim, ferro de buda, oolong e pu-erh, com diferentes graus de fermentação, foram examinados quanto ao seu efeito sobre a hipercolesterolemia induzida pela dieta, em ratos. Os ratos foram tratados, durante mais de 8 semanas, com diferentes extractos de chá juntamente com uma dieta enriquecida em colesterol. O chá verde chinês e o chá de jasmim, ambos com um grau mínimo de fermentação, reduziram significativamente o efeito do colesterol no sangue e no fígado, e também reduziram o aumento no peso do fígado devido à deposição de lípidos. Todos os tratamentos com os diversos chás reduziram o índice aterogénico e aumentaram a razão de HDL-colesterol total, enquanto os triglicéridos não foram significativamente afectados. A análise dos níveis de catequina nos extractos do chá mostrou que o teor de catequinas no chás verde e de jasmim foram significativamente maiores do que nos outros chás. O (-)-galato de epicatequina; (-)-e o galato de

epigallocatequina nos extractos de chá podem assim contribuir para o efeito hipocolesterolémico destes chás (Yang & Koo, 1997). Outros estudos foram feitos para investigar os efeitos do chá verde (*Camellia sinensis*) em pacientes portadores de dislipidemias. Foi demonstrado o efeito benéfico do chá verde que reduziu significativamente, em oito semanas, os níveis de colesterol total e de LDL-colesterol nesse grupo de pacientes (Batista *et al.*, 2009).

Há evidências crescentes de que a acumulação excessiva de espécies reactivas de oxigénio, que ocorre durante o envelhecimento normal ou patológico do cérebro, contribui para as perdas neuronais e para a disfunções neuro-degenerativas, como as doenças de Alzheimer e de Parkinson. Estas doenças são definidas por uma disfunção neuronal progressiva e uma consequente disfunção comportamental. Com base nessas observações foi levantada a hipótese de que os antioxidantes naturais, derivados de produtos alimentares e bebidas e extractos naturais, poderem ser benéficos para prevenir ou retardar a ocorrência de doenças, relacionadas com a idade, com a deficiência cognitiva e neuro-degenerativa. Os polifenóis do chá verde têm sido estudados como agentes terapêuticos, em estudos epidemiológicos bem controlados, com o objectivo de reduzir os processos de envelhecimento do cérebro e como possíveis agentes neuroprotectores em doenças neuro-degenerativas progressivas (Weinreb *et al.*, 2004).

Os benefícios para a saúde resultantes do consumo de compostos bioactivos são frequentemente relacionados com as suas propriedades antioxidantes, mas outros mecanismos, envolvendo os efeitos modulatórios nas vias de transdução de sinal e expressão do gene, provavelmente também desempenham um papel importante na acção biológica destes compostos. Estes mecanismos múltiplos de acções, que podem ser sinérgicos ou aditivos, podem explicar a variabilidade na eficácia clínica de cada componente ou extracto. Até à data, a vitamina E e EGb 761 (extracto padronizado de *Ginkgo biloba* rico em polifenóis) são apontados como os antioxidantes naturais mais eficazes a nível neurológico e cardiovascular, no entanto a vitamina E não mostrou um benefício significativo na redução da incidência de AVC (Bastianetto & Quirion, 2004).

Há estudos que mostraram que os extractos de *Camellia sinensis*, semi-fermentados e não fermentados, foram capazes de impedir o crescimento de estreptococos orais, ou seja, reduzir significativamente a cárie dentária. Esse estudo mostrou ainda que a eficiência do chá semi-fermentado foi maior do que o do chá não fermentado, por o chá semi-fermentado ser mais rico no conteúdo dos componentes voláteis. Estes inibem *in vitro*, mais eficazmente a aderência dos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis* reduzindo significativamente as cáries dentárias (Hassani, 2008). O extracto aquoso da folha verde de *Camellia sinensis* (450 mg kg⁻¹) tem um efeito acentuado na redução da glicose plasmática de 30% do valor controlo após 2 horas de carga. Os resultados deste estudo indicam que o extracto aquoso de chá tem um efeito anti hiperglicémico significativo que pode ser causado, em parte, pela diminuição da absorção intestinal da glucose (Shokrzadeh *et al.*, 2006). Muitos outros estudos confirmam que o chá verde e preto pode actuar em várias funções celulares e tem um impacto positivo sobre o cancro e as doenças cardiovasculares, sendo provável a sua utilidade noutras doenças. Assim, o uso dos componentes do chá como alimento funcional e nutracêutico está a ser cada vez mais estudado. Os efeitos benéficos do chá na saúde neurológica e psicológica também foram relatados (Dufresne, 2001).

Alguns estudos experimentais e epidemiológicos visam estudar o efeito do chá verde e/ou seus compostos bioactivos no metabolismo lipídico e na redução da gordura corporal. Assim estão a ser estudados os efeitos anti-obesidade relacionados com o galato de epigallocatequina, o principal composto bioactivo presente no chá. Tais efeitos estão associados a diversos mecanismos bioquímicos

e fisiológicos, dos quais se podem destacar a estimulação do metabolismo lipídico pela combinação da ingestão de catequinas e a prática de exercícios físicos regulares. Assim, com o objectivo de obter uma redução de gordura corporal torna-se importante aliar o consumo do chá verde a um plano alimentar equilibrado, além da prática frequente de actividade física, condutas consideradas favoráveis para acelerar o metabolismo energético (Lamarão & Fialho, 2009).

1.4.5 - Efeitos nocivos do chá

Os produtos à base de plantas são amplamente aceites entre a população em geral e, em muitos casos, as evidências sobre a sua segurança e eficácia não estão bem estabelecidas. A toxicidade hepática associada ao aumento da utilização de produtos "remédios naturais" é um fenómeno emergente. A hepatotoxicidade causada por plantas medicinais e/ou suplementos dietéticos não é excepcional, e o seu perfil é a hepatite aguda hepatocelular, predominantemente em mulheres. A recorrência frequente deste tipo de problema indica uma baixa eficiência no seu diagnóstico (Garcia-Cortes *et al.*, 2008).

Um dos exemplos de toxicidade hepática associada com o consumo de extractos de chá foi decorreu do consumo do extracto etanólico da *Camellia sinensis* que foi aprovado para o tratamento temporário da obesidade moderada, com acompanhamento da dieta. O mecanismo de acção deste extracto é duplo: por um lado inibe as lipases pancreática e gástrica, e por outro, estimula a termogénese, resultando numa redução e retardamento da absorção de energia e aumento da gordura. Devido a vários casos de hepatite clinicamente significativos, o Ministério da Saúde Espanhol aboliu a sua comercialização em 07 de Abril de 2003 para esta finalidade (Wafa *et al.*, 2005). Num estudo neuro-farmacológico, um extracto de chá, obtido por infusão de 2 g de chá verde *C. sinensis* [camélia (Vari. assamica)] em 10 ml de água, foi administrado a animais, ratos Wistar de ambos os sexos, adultos (150-200 gramas) e ratinhos (20-30 gramas). A actividade ansiolítica foi avaliada pelo labirinto em cruz elevada, em testes em campo aberto, e os resultados sugeriram que o chá de *Camellia sinensis* poderá potenciar a actividade ansiolítica, quando consumido em doses equivalentes (Ashish *et al.*, 2010).

Capítulo 2 – Composição mineral e nutricional de chás pretos e verdes dos Açores

2.1 - Introdução

O chá (*Camellia sinensis*) é uma das bebidas mais populares em todo o mundo, e contém vários nutrientes essenciais que são benéficos para a saúde humana. Está estimado que são consumidas diariamente 18 a 20 biliões de chávenas de chá (Marcos *et al.*, 1998).

A qualidade do chá depende da composição orgânica e inorgânica dos rebentos e folhas colhidos, que são transformados em chá e são responsáveis pelo sabor, aroma e cor da infusão preparada (Sedaghatthoor *et al.*, 2009).

A composição química das folhas de chá e das suas infusões é complexa, sendo na sua maioria (>90% (m/m)) uma mistura de diferentes compostos orgânicos, incluindo polifenóis, alcalóides, proteínas, aminoácidos, enzimas, compostos voláteis e seus precursores, hidratos de carbono e vitaminas. Além destes compostos, as folhas de chá e as infusões são ricas também em elementos minerais. O teor destes componentes é característico para os diferentes tipos de chá e é influenciado pela forma específica como os chás são produzidos e processados, nomeadamente pela origem geográfica das plantas, a composição do solo, o clima, as condições ambientais locais, a estação do ano, a idade da folha, a variedade do chá e as práticas agrícolas (Welna *et al.*, 2013).

Deve também notar-se que a absorção de metais pelas plantas não se faz somente pelas raízes. Os insecticidas, herbicidas e fertilizantes são também possíveis fontes de contaminação de alguns componentes que podem ser absorvidos pelas próprias folhas. O tipo de chá (preto, oolong ou verde) também pode afectar a concentração de elementos vestigiais pois pode ocorrer a sua mobilização durante os processos fermentativos (Marcos *et al.*, 1998).

Quando são confeccionados os chás, os elementos presentes nas folhas são diferencialmente extraídos para as infusões, tornando a bebida preparada numa fonte de componentes minerais em concentrações elevadas (macroelementos), baixas (microelementos) ou vestigiais (traços).

O corpo humano necessita de elementos metálicos e não-metálicos para o crescimento e desenvolvimento saudável e para o seu bom funcionamento. Muitos dos elementos metálicos e não metálicos presentes nas infusões fazem parte do chamado grupo de elementos essenciais, assim denominados porque são necessários para o correcto funcionamento do metabolismo dos seres vivos. Existem outros elementos cuja presença nos seres vivos pode perturbar seriamente o seu metabolismo, originando fenómenos de intoxicação aguda ou crónica, pelo que se denominam por elementos tóxicos (Fernandez *et al.*, 2010; Welna *et al.*, 2013).

Os elementos não metálicos com maior interesse biológico são o carbono (C), o hidrogénio (H), o azoto (N), o oxigénio (O), o fósforo (P), o enxofre (S) e o cloro (Cl). Os elementos não metálicos vestigiais são o boro (B), o selénio (Se), o silício (Si), o fluor (F) e o iodo (I) (Shukla *et al.*, 2007).

Durante as últimas décadas, uma extensa pesquisa tem vindo a ser realizada sobre o papel dos componentes minerais na dieta humana. Os metais pesados são os elementos mais frequentemente controlados devido à sua toxicidade e ao facto de apresentarem a capacidade de acumulação na cadeia alimentar. Os seus níveis máximos tornaram-se padrões mundiais de qualidade. Para os elementos essenciais e não-essenciais também são estabelecidos doses diárias e máximas recomendadas na dieta humana. Verificou-se que níveis elevados de elementos essenciais e não-essenciais podem causar alterações morfológicas, tais como a redução de crescimento, o aumento da mortalidade e efeitos

mutagénicos nos seres humanos. Numa dieta equilibrada o consumo de todos os nutrientes, em quantidades adequadas para manter o peso corporal, é desejável e necessária (Malik *et al.*, 2008).

A ingestão regular de chá pode contribuir significativamente para as doses diárias recomendadas de alguns elementos essenciais, nutricionalmente importantes como por exemplo, Cr, K, Mn, Ni e Zn (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012).

O consumo de cinco chávenas de chá verde fornece cerca de 5% da dose diária recomendada de magnésio, 25% de potássio e 45% de manganês. O chá verde também é rico em flúor. Um único copo de chá verde fornece cerca de 0,1 mg de fluoreto, o que é um teor mais elevado do que o encontrado em água fluorada (Shukla, 2007).

Infelizmente, a planta *Camellia sinensis* pode tolerar e bioacumular quantidades muito elevadas de Al e F e de outros elementos não essenciais e indesejáveis, como por exemplo, Pb, As, Cd e Hg que podem ter a sua origem a partir de poeiras atmosféricas, chuvas ou fertilizantes utilizados durante as fases de crescimento da planta ou de processos de fabricação. A contribuição destes elementos tóxicos nas infusões de chá pode também ser elevada, podendo um consumo de infusões de chá contribuir para o aumento de elementos tóxicos no organismo e, consequentemente, aumentar o risco de envenenamento, especialmente quando se considera a tendência para se acumular no corpo humano (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) causando efeitos adversos sobre o bem-estar (Welná *et al.*, 2013).

A contaminação de folhas de chá por metais pesados pode assim representar uma grave ameaça para a saúde, porque os metais pesados não são biodegradáveis, entram na cadeia alimentar e permanecem no ambiente (Lima *et al.*, 2009).

Alguns autores mostraram que o alumínio estimula o crescimento de *Camellia sinensis*. Contudo, o modo pelo qual o alumínio influencia o crescimento ainda não foi completamente elucidado; sugere-se que o alumínio poderá interagir com outros elementos como o H⁺ ou o fósforo, diminuindo a respectiva toxicidade (Lima *et al.*, 2009). Este estudo refere ainda que outros elementos minerais acumulados pela *Camellia sinensis*, como o K e Mg, Mn, Ca, Zn, Cr e Ni, além de Se e F, são alguns dos elementos essenciais para a saúde humana. O ferro, o zinco, o cobre e o manganês, essenciais para o crescimento e desenvolvimento saudável dentro de certos limites admissíveis, podem causar toxicidade crónica em humanos quando ingeridos em excesso.

A composição química média dos chás verdes em comparação com os chás pretos e as suas infusões é apresentada na tabela 2.1.

Tabela 2. 1 - Composição média (%) dos chás verde e preto e suas infusões (Cabrera *et al.*, 2006)

| Composto | Chá verde ^a | Chá preto ^a | Infusões ^b |
|------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| Proteínas | 15 | 15 | vestígios |
| Aminoácidos | 4 | 4 | 3,5 |
| Fibra | 26 | 26 | 0 |
| Outros carboidratos | 7 | 7 | 4 |
| Lípidos | 7 | 7 | Vestígios |
| Pigmentos | 2 | 2 | Vestígios |
| Minerais | 5 | 5 | 4,5 |
| Compostos fenólicos | 30 | 5 | 4,5 |
| Compostos fenólicos oxidados | 0 | 25 | 4,5 |

^a Dados referentes a peso de folhas secas; ^b tempo de infusão 3 minutos.

Os principais constituintes das folhas de chá pertencem ao grupo de polifenóis que é responsável por cerca de 30%, do seu peso seco (Tabela 2.1). Alguns dos polifenóis do chá mais importantes e característicos são flavanóis, predominantemente, catequinas. As catequinas do chá podem reagir com radicais de oxigénio e impedir as reacções oxidativas em cadeia (Sang *et al.*, 2002).

Existem no entanto parâmetros que têm um grande impacto sobre a quantidade e a composição de polifenóis no extracto de chá e portanto sobre a sua capacidade antioxidante. Entre estes parâmetros podemos referir, a composição do solvente de extracção, a temperatura, o tempo de extracção, a razão das quantidades solvente/chá e as condições de armazenagem (Michiels *et al.*, 2012).

2.1.1 – Determinação dos teores de humidade, de cinzas e de azoto

A determinação do teor de água é análise mais frequentemente realizada em produtos alimentares e muito significativa em muitos aspectos. Quase todos os produtos alimentares contêm água e este parâmetro afecta muitos outros, tanto de natureza física, como química e microbiológica. A avaliação da maioria dos parâmetros químicos baseia-se na massa seca e, por conseguinte, o teor de água deve ser medido previamente (Imran *et al.*, 2011). A matéria seca que permanece após a remoção da humidade é normalmente referida como sendo o teor de sólidos totais. Este valor analítico é também de grande importância económica para a indústria porque a água é um componente barato (Nielson, 2003).

O chá é produzido a partir do rebento fresco e de folhas da planta do chá, depois de uma série de reacções físicas e químicas nas várias etapas do seu processamento. De um modo geral, as operações de processamento do chá são acompanhadas de grandes variações no teor de humidade. Existem três procedimentos principais de processamento do chá verde: fixação, laminação e secagem. O procedimento de fixação envolve exposição a alta temperatura com a finalidade de reduzir a actividade enzimática e eliminar os componentes de odor herbáceo, o que leva à evaporação de alguma água. O processo de secagem desidrata o chá reduzindo o teor de humidade até valores adequados à sua conservação e melhorando o cheiro e o gosto do chá através de promoção de reacções termoquímicas entre os componentes precursores do sabor e aroma (Li *et al.*, 2012).

O conteúdo de água de qualquer produto em equilíbrio com a atmosfera envolvente é designado como o conteúdo de humidade de equilíbrio ou de equilíbrio higroscópico. O teor de humidade de equilíbrio é útil para determinar se um produto vai ganhar ou perder humidade sob um dado conjunto de condições de temperatura e humidade relativa. Assim, o conteúdo de humidade de equilíbrio de um chá está directamente relacionado com os procedimentos de secagem e armazenamento e depende também da espécie vegetal, da variedade e da maturidade das folhas (Ghodake, 2007). Um teor elevado de humidade favorece as actividades microbianas, de oxidação e de crescimento de fungos. Assim, a variação da humidade deve ser controlada efectuando uma secagem adequada ao tipo de chá envolvido (Mohammed, 2009).

Os teores de humidade do chá condicionam de forma determinante a qualidade deste produto pois, não só influenciam o tempo útil de prateleira/armazenamento (Imran *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012) como também afectam as reacções físicas e químicas que ocorrem durante o processamento de chá (Li *et al.*, 2012), como por exemplo, a relação entre a teaflavina e as tearrubinas que é um parâmetro importante para a avaliação organoléptica deste produto (Imran *et al.*, 2011).

O teor de cinzas é definido como o resíduo inorgânico que resta após a queima (cinza seca) ou a completa oxidação da matéria orgânica (cinza húmida) de um determinado alimento (Nielson, 2003).

Na cinza seca, a água é evaporada, os componentes voláteis são volatilizados e a matéria orgânica é queimada na presença de oxigénio originando dióxido carbono (CO₂) e óxidos de azoto. A maioria dos elementos minerais é convertida em óxidos, sulfatos, fosfatos, cloretos e silicatos. Elementos como o ferro (Fe), selénio (Se), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) podem ser parcialmente vaporizados no decorrer deste procedimento pois dão origem a derivados relativamente voláteis na gama de temperaturas utilizada (Nielson, 2003).

A determinação do teor de cinzas é assim importante por dar uma indicação aproximada do conteúdo mineral de um alimento o que permite compará-lo com outros alimentos do mesmo tipo (Nielson, 2003). Um chá com um elevado teor de cinzas, poderá ser uma boa fonte de minerais (Mohammed, 2009).

As proteínas são os componentes mais abundantes das células e quase todas, com excepção das proteínas de armazenamento, têm funções biológicas e estruturais. As proteínas podem ser classificadas de acordo com a sua composição, com a função estrutural, pela função biológica ou pela solubilidade. As proteínas podem ainda, por terem uma conformação fixa, ser desnaturadas por calor, ácidos, bases, solventes orgânicos e detergentes. A solubilidade das proteínas pode assim ser alterada (Nielson, 2003).

A determinação do teor de proteínas é um procedimento complexo uma vez que os alimentos têm componentes que apresentam propriedades físico-químicas similares. O azoto não proteico pode ter origem em aminoácidos livres, pequenos peptídeos, ácidos nucleicos, fosfolípidos, açúcares aminados ou algumas vitaminas, alcaloides, ácido úrico, ureia e iões amónia. Contudo, o azoto orgânico tem prioritariamente origem nas proteínas e em menor percentagem de compostos contendo ligações azoto orgânico – não proteínas (Nielson, 2003).

Na maioria dos alimentos o azoto corresponde aproximadamente a 16% do peso da proteína, o que implica indirectamente que em 100 g de proteína existem 16 g de azoto, e $100/16 = 6,25$ que corresponde ao factor de conversão de azoto:proteína. O uso deste factor considera que todo o azoto recuperado é proveniente, principalmente, da proteína e que a contribuição de substâncias azotadas não-protéicas é desprezível. Contudo, o factor de conversão 6,25 não pode ser aplicado universalmente a todos os alimentos, pois a percentagem de azoto na proteína é variável em função da composição em aminoácidos e da presença de azoto de outras origens (Guimarães, 2005).

2.1.2 - Teor de compostos fenólicos totais

O chá verde é caracterizado pelo seu teor elevado em polifenóis (20-30% do peso seco) (Komes *et al.*, 2010) sendo este grupo de compostos o componente principal e funcional, mas também um importante parâmetro de qualidade do chá (Danrong *et al.*, 2009). Este grupo inclui flavonóides, flavanodíolis, e ácidos fenólicos, aparecendo os flavonóides numa proporção de 70-80% dos polifenóis (Danrong *et al.*, 2009; Komes *et al.*, 2010). Os flavonóides mais importantes são as catequinas que representam cerca de 10% do peso em base seca (Komes *et al.*, 2010).

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Angelo & Jorge, 2007). Quando os polifenóis se combinam com iões, como Ca²⁺ e Mg²⁺ existentes na água, estes podem ficar parcialmente retidos no resíduo de chá (Danrong *et al.*, 2009).

Os fenóis do chá são responsáveis pela sua actividade antioxidante. As catequinas puras e os ácidos fenólicos encontrados no chá são mais poderosos que antioxidantes bem conhecidos como as vitaminas C e E e o β -caroteno num modelo *in vitro* a oxidação da lipoproteína. Comparação das fracções de chá indicaram que quer as catequinas, quer as teaflavinas contribuem para as suas características antioxidantes (Vinson & Dabbagh, 1998).

Os flavonoides, um grupo de compostos polifenólicos, estão amplamente distribuídos nas plantas, nomeadamente nas dos chás. Os flavonóides e derivados, particularmente os da quercetina, têm recebido muita atenção como componentes alimentares nos últimos anos. Estudos experimentais demonstraram que possuem inúmeros efeitos benéficos na saúde humana, incluindo a protecção cardiovascular, actividade anticancerígena, efeitos antiulcerosos e efeitos antialérgicos, antivirais e anti-inflamatórios. Esta actividade de promoção da saúde parece estar relacionada com a actividade antioxidante natural de flavonoides (Shaghghi *et al.*, 2008).

Entre os diferentes chás, o teor de polifenóis, determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, está normalmente presente em níveis de concentração na ordem dos mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por litro de chá (Tabela 2.2).

Tabela 2. 2 - Concentrações de fenólicos totais em extractos de folhas de chás verdes e pretos disponíveis em diversos países.

| Extrato Aquoso / Infusões | Teor de Polifenóis Totais | Unidade | Autor |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Chá verde | 23,6 \pm 5,4 | mM GAE | Carlioni <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá verde com baixo teor de cafeína | 22,6 \pm 5,0 | mM GAE | Carlioni <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá branco | 18,1 \pm 5,5 | mM GAE | Carlioni <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto CTC | 10,7 \pm 4,0 | mM GAE | Carlioni <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto ortodoxo | 14,9 \pm 5,9 | mM GAE | Carlioni <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá verde liofilizado | 154,7 – 173,5 | mg GAE/g folha seca | Javasckera <i>et al.</i> , 2011 |
| Chá preto Sri-Lanka | 115,2 – 162,9 | mg GAE/g folha seca | Javasckera <i>et al.</i> , 2011 |
| Chá preto | 30,5 \pm 0,62 | mg GAE/g | Turkmen <i>et al.</i> , 2006 |
| Rebentos | 7666 \pm 448 | mg GAE/100 g | Chan <i>et al.</i> , 2007 |
| Folhas jovens | 7280 \pm 126 | mg GAE/100 g | Chan <i>et al.</i> , 2007 |
| Folhas maduras | 5836 \pm 294 | mg GAE/100 g | Chan <i>et al.</i> , 2007 |
| t = 3 min | | | |
| Chá preto, Ceilão | 847 \pm 8,89 | mg GAE/240 mL | Atoui <i>et al.</i> , 2005 |
| Chá verde Chinês | 1216 \pm 32,0 | mg GAE/240 mL | Atoui <i>et al.</i> , 2005 |
| t = 5 min | | | |
| Chá de Ceilão (Ahmad) | 28,1 \pm 1,1 | μ g QE/mL | Shaghghi <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá de Ceilão (Alghazalen) | 22,1 \pm 1,1 | μ g QE/mL | Shaghghi <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá Golestan | 23,0 \pm 1,0 | μ g QE/mL | Shaghghi <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá verde | 4,8 \pm 0,10 – 26,60 \pm 0,56 | mg pirogalol/ g | Pereira <i>et al.</i> , 2009 |
| Chá preto | 17,73 \pm 1,14 – 23,33 \pm 0,55 | mg pirogalol/ g | Pereira <i>et al.</i> , 2009 |
| Chá preto | 1844 \pm 15,7 | mg GAE/L | Almajano <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá verde | 2083 \pm 51,3 | mg GAE/L | Almajano <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá preto, Brasil (saco) | 120,4 \pm 0,01 – 133,9 \pm 0,01 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Índia (saco) | 132,9 \pm 0,01 – 240,4 \pm 0,01 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Inglês (saco) | 270,2 \pm 0,08 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Inglês (granulado) | 205,6 \pm 0,02 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Índia (granulado) | 170,2 \pm 0,01 – 274,3 \pm 0,01 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |

Tabela 2.2 (Continuação)

| | | | |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|---|
| t = 10 min | | | |
| Chá verde | 2,72±0,13 | mg GAE/mL | Ho <i>et al.</i> , 2010 |
| Chá preto | 2,50±0,03 | mg GAE/mL | Ho <i>et al.</i> , 2010 |
| t = 15 min | | | |
| Chá verde | 8,7 – 10,6 | mg GAE/100g | Khokhar & Magnúsdóttir, 2002 <i>in</i> Stodt <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Brasil (saco) | 153,2±0,01 – 189,7±0,02 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Índia (saco) | 258,5±0,01 – 299,4±0,01 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Inglês (saco) | 268,0±0,04 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Inglês (granulado) | 284,5±0,01 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto, Índia (granulado) | 163,2±0,02 – 181,9±0,05 | mg GAE/g | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá preto | 8,05 – 13,5 | mg GAE/100g | Khokhar & Magnúsdóttir, 2002 <i>in</i> Stodt <i>et al.</i> , 2013 |
| Extracto de 50% acetona | | | |
| Chá preto | 92,4±0,83 | mg GAE/g | Turkmen <i>et al.</i> , 2006 |
| Extracto Aquoso | | | |
| Chá verde | 19126±365 | mg GAE/100g | Chan <i>et al.</i> , 2007 |

GAE – equivalentes de ácido gálico; QE – equivalentes de quercitina

Para a determinação do teor de fenólicos totais, pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, existem estudos que mostram a existência de interferentes. Esses estudos mostram que este método muito tem/pode ter subestimado o teor de fenólicos totais (Lester *et al.*, 2012; Cicco *et al.*, 2009; Vinson *et al.*, 2001; Cicco *et al.*, 2011). No entanto, outros estudos mostram que este método tem sobrestimado o conteúdo de polifenóis (Escarpa *et al.*, 2001; Porgali *et al.*, 2012).

A interferência na reação de Folin-Ciocalteu pode ser negativa como se verifica no caso de amostras que contêm ácido ascórbico, que é um composto redutor (antioxidante não-fenólico) e um componente natural que reduz o reagente Folin-Ciocalteu (polifosfotungstato-molibdato) para formar uma cor azul, em pH alcalino (Lester *et al.*, 2012). A mesma interferência pode ser verificada quando as misturas finais da reacção contêm mais de 4% (v/v) de álcool. Quando a concentração de álcool sobe para além de 4%, o grau de saturação do reagente nas misturas diminui reduzindo a propriedade dieléctrica do meio, o que, consequentemente afecta o desenvolvimento da cor (Cicco *et al.*, 2009; Cicco *et al.*, 2011).

Por outro lado, quando comparado o método de cromatográfico, o qual foi tomado como método de referência por ser livre de interferentes, com o espectrofotométrico não directo verifica-se que o método de Folin-Ciocalteu apresenta interferência principalmente devido à presença de compostos não-fenólicos nas amostras. Os açúcares solúveis totais não mostraram interferência enquanto a proteína parcialmente solúvel mostrou uma grande influência sobre os fenóis totais nas gamas de concentração encontradas nos extractos (Escarpa *et al.*, 2001; Ghali *et al.*, 2003).

Noutro estudo de comparação do método espectrofotométrico com um método de cromatografia (Porgali *et al.*, 2012) houve uma diferença significativa em compostos fenólicos obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu e por análise de HPLC. A razão apresentada para esta discrepância é que a: análise dos compostos fenólicos individuais não incluem os taninos, os diterpenos fenólicos e fenólicos voláteis, pelo que a sua contribuição para o conteúdo fenólico total não está envolvido no método de HPLC; e a falta de selectividade apropriada de medições espectrofotométricas directas.

2.1.3 - Composição mineral

Os minerais são nutrientes essenciais, inorgânicos e não calóricos. Essenciais pois o organismo é incapaz de os sintetizar, inorgânicos pois não possuem carbono e não calóricos porque não são fornecedores de energia.

Entre os elementos essenciais, os macroelementos, encontram-se o sódio (Na), o fluor (F), o potássio (K), o magnésio (Mg), o alumínio (Al), o fósforo (P), o enxofre (S), o cálcio (Ca) e o manganésio (Mn). Como microelementos temos o boro (B), o Titânio (Ti), o crómio (Cr), o ferro (Fe), o níquel (Ni), o cobre (Cu), o zinco (Zn), o rubídio (Rb), o estrôncio (Sr), molibdénio (Mo), o iodo (I) e o bário (Ba). Como elementos vestigiais temos o lítio (Li), o berílio (Be), o silício (Si), o vanádio (V), o cobalto (Co), o arsénico (As), o selénio (Se), o ítrio (Y), o zircónio (Zr), prata (Ag), o cádmio (Cd), o índio (In), o estanho (Sn), o antimónio (Sb), o telúrio (Te), o tungsténio ou volfrâmio (W), o mercúrio (Hg), o tálio (Tl), o chumbo (Pb) e o bismuto (Bi) (Fernandez *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2007; Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012; Welna *et al.*, 2013).

Alguns destes elementos, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Se, V e Zn, independentemente da sua abundância, são essenciais para a saúde humana e podem contribuir para o valor nutricional do chá. (Welna *et al.*, 2013).

Como referido anteriormente, o consumo regular de chá pode contribuir para as necessidades diárias alimentares de alguns destes elementos. Mas teores mais elevados desses elementos podem ter efeitos adversos na saúde humana, por exemplo, a acumulação de alumínio (Al) por consumo de infusões de chá pode estar está associado com a doença de Alzheimer. A contaminação de cobre (Cu) em folhas de chá continua a ser uma preocupação, e devem ser usadas práticas para garantir a segurança alimentar no que respeita à contaminação excessiva por Cu. A contaminação do chá pelo Pb é um problema que afecta o comércio e a confiança do consumidor. A absorção radicular de Pb contribui significativamente para a acumulação de Pb nas folhas de chá, quando existe forte acidez dos solos e a adição de CaCO₃ neutraliza a acidez contribuindo para a diminuição deste tipo de contaminação (Han *et al.*, 2007). De maneira semelhante, o conteúdo de outros oligoelementos no chá, como o arsénio (As), o cádmio (Cd), o crómio (Cr), o flúor (F), o chumbo (Pb), o manganês (Mn) e o níquel (Ni), foram investigados em muitos países do sul asiático e nos países onde o chá é uma bebida tradicional (Karak, 2010).

O cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) são metais que apresentam uma toxicologia associada. Tem sido relatado que, em algumas infusões de chá, os metais tóxicos excedem os limites máximos permitidos estipulados para diferentes países (Karak, 2010).

Os minerais desempenham diversas e importantes funções no organismo, que incluem a participação no funcionamento enzimático, constituição de hormonas, transmissão de impulsos nervosos, contracção muscular, manutenção do equilíbrio hidro-electrolítico e manutenção de tecidos (Almeida & Afonso, 1997).

O comportamento biológico de alguns dos elementos minerais é indicado abaixo:

Sódio, Na – Quando as concentrações fisiológicas requeridas para cada ião não são as que se verificam é necessário bombear os iões desde o exterior para o interior da célula com gasto de energia. O sistema mais estudado para este transporte activo tem sido o de Na⁺/K⁺.

Magnésio, Mg – O Mg tem uma diversidade de funções nos sistemas vivos. Estas funções derivam das suas características como iões bivalentes e inertes em processos redox. A sua elevada carga associada ao seu pequeno tamanho não lhe conferem um carácter fortemente polarizante.

Alumínio, Al - Tem sido observado que a doença de Alzheimer aparece associada à presença de alumínio (Al), na sua maioria derivado ao consumo de alimentos por um período de tempo prolongado. Um teor elevado de Al no chá pode ser um motivo de preocupação (Karak, 2010). Os compostos polifenólicos, especialmente os flavonóides presentes no chá, são importantes para a ligação de metais tais como o Al, Fe e Cu. Foi observado que, em condições ácidas, o Al é acumulado em plantas de chá principalmente nas folhas mais velhas (média 5600 mg kg⁻¹) seguido por folhas jovens (média 997 mg kg⁻¹) (Karak, 2010).

Potássio, K – O K tem um papel importante como estabilizador das estruturas dos ácidos nucleicos.

Cálcio, Ca – O Ca é um elemento que se encontra nos seres vivos em elevada proporção e realiza funções muito diversas, que vão desde a sua presença em sais minerais que realizam funções de sustentação do endoesqueleto, ou de defesa e protecção em exoesqueletos, até a sua actuação como ácido de lewis em processos hidrolíticos ou, mais comumente como segundo mensageiro celular. Pela sua carga e tamanho é capaz de se ligar a proteínas cujas alterações estruturais desencadeiam, como resposta, processos fisiológicos cruciais como a contracção muscular (Fernandez *et al.*, 2010). É importante a sua ingestão ao longo da vida de modo a permitir uma adequada formação, manutenção e recuperação do esqueleto (Almeida & Afonso, 1997).

Arsénio, As - O arsénico é um elemento mutagénico e carcinogénico e altamente tóxico para as plantas e animais. Vários relatos sobre arsénio em alimentos e bebidas têm sido realizados para avaliar a ingestão dietética diária de arsénio para os seres humanos (Karak *et al.*, 2010).

Cádmio, Cd - O chá pode ser contaminado por Cd durante o período de crescimento e nos processos de fabrico o que poderá conduzir a um aumento da carga de Cd em seres humanos. O teor de Cd constituinte de folhas de chá é normalmente diferente de acordo com o tipo de chá (verde ou preto) e a fonte geológica (Marcos *et al.*, 1998). As principais fontes de Cd em plantas de chá são os seus nutrientes, fertilizantes agrícolas e do solo (Seenivasan *et al.*, 2008 *in* Karak *et al.*, 2010). A concentração de Cd nas folhas dos diferentes chás varia de 0,03 a 0,08 mg kg⁻¹ (Karak *et al.*, 2010).

Chumbo, Pb - O chumbo (Pb) foi identificado como um dos contaminantes que mais comumente ocorrem no ambiente. Os efeitos adversos à saúde são causados por um baixo nível de exposição ao Pb. Hoje em dia, as concentrações de Pb em folhas de chá comerciais têm causado preocupação para os consumidores e produtores. O limite permitido de Pb para alimentos e bebidas na Europa e na China é de 5 mg kg⁻¹, no Japão de 20 mg kg⁻¹, enquanto na Austrália, Canadá e Índia é de 10 mg kg⁻¹. O valor de referência de Pb para a água potável é de 0,01 mg L⁻¹ (Karak *et al.*, 2010).

Cobalto, Co - O cobalto realiza funções biológicas muito específicas e outras mais habituais e que podem ser desempenhadas por outros metais. As moléculas que contêm o Co são as coenzimas, derivados da vitamina B12 e as metaloproteínas que contêm este metal (Fernandez *et al.*, 2010).

Cobre, Cu - Nos sistemas biológicos o cobre faz parte de numerosas proteínas e as suas funções estão relacionadas fundamentalmente com o transporte electrónico e com a activação do oxigénio (Fernandez *et al.*, 2010). O cobre (Cu) é um micronutriente para as plantas, mas também é altamente

fitotóxico em concentrações elevadas. O consumo excessivo de Cu, pela ingestão de alimentos e bebidas é prejudicial para a saúde humana. Assim, o conteúdo de Cu na água, alimentos e bebidas deve ser rastreado e controlado numa base diária. A ingestão diária média de Cu por uma pessoa através da ingestão de alimentos e bebidas é de $2,5 \text{ mg}^{-1}$ dia com um intervalo de 2-3mg dia⁻¹ (Karak *et al.*, 2010)

Ferro, Fe - O ferro é o metal de transição mais abundante nos seres vivos (4,2 a 6,1 g num adulto), formando uma grande quantidade de biomoléculas. As suas funções biológicas mais conhecidas são o transporte e armazenamento de oxigénio, os processos de transferência electrónica e a activação do oxigénio e azoto (Fernandez *et al.*, 2010).

Manganésio, Mn - Um adulto de 70 kg de peso tem 10-20 mg de Mn, uma quantidade que é cerca de 250 vezes menor que a de ferro. O papel biológico do manganésio é fundamentalmente a sua presença em algumas metaloenzimas podendo também funcionar como activador de outras (Fernandez *et al.*, 2010). O manganês (Mn) não tem significado generalizado devido aos seus efeitos sobre a aceitabilidade como um elemento essencial para os seres humanos e outros animais. No entanto, os efeitos adversos de Mn podem resultar tanto de deficiência como de sobre-exposição. O manganês é conhecido por causar efeitos neurológicos após exposição por inalação, particularmente em ambientes de trabalho. Há estudos epidemiológicos que relatam efeitos adversos neurológicos após a exposição prolongada a níveis muito elevados na água potável (Powell *et al.*, 1998 *in* Karak *et al.*, 2010). O Mn é assim um metal associado a doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, e pode mesmo causar a morte por envenenamento (Amarante *et al.*, 2011).

Molibdénio, Mo - Um adulto contém aproximadamente 9,3 mg de Mo, dos quais cerca de 5 mg encontram-se no esqueleto e cerca de 2,0 mg no fígado. As necessidades de um adulto estão compreendidas entre 0,075 e 0,250 mg/dia (Fernandez *et al.*, 2010).

Níquel, Ni - O Ni é um elemento essencial para o crescimento das plantas em baixas concentrações. No entanto este elemento torna-se tóxico para a maioria das espécies de plantas (Karak *et al.*, 2010).

Zinco, Zn - Do ponto de vista bioquímico, o Zn é um metal importante por diversas razões, que vão desde o seu papel enzimático até às funções de transcrição génica, passando pelo papel neuroregulador. Este é assim um metal essencial ao crescimento e ao desenvolvimento de todas as formas de vida (Fernandez *et al.*, 2010).

Entre os diferentes elementos nos chás, os principais constituintes estão normalmente presentes em níveis de concentração na ordem dos mg/g. Alguns dos elementos que existem em concentrações menores e mesmo vestigiais estão presentes em concentrações na ordem dos $\mu\text{g/g}$ até aos mg/g. Os níveis de concentração dos elementos tóxicos são normalmente muito baixos mas as suas concentrações podem variar significativamente dependendo dos diferentes tipos de chá (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012). Estas diferenças podem ser verificadas nas tabelas 2.3 e 2.4 que a seguir se apresentam.

Tabela 2. 3 – Gama de concentrações dos macromelementos (Al, Ca K, Mg, Mn, Na, P, S) em folhas de chá ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco) e infusões (%) em chás verdes e pretos disponíveis em diversos países (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012; Karak *et al.*, 2010; Seenivasan *et al.*, 2008; Özcan *et al.*, 2008; Ansari *et al.*, 2007; Gallaher *et al.*, 2006; Ferrara *et al.*, 2001; Marcos *et al.*, 1998).

| Macroelementos | Matriz | Chá verde | Chá preto |
|----------------|----------|------------------------------|-------------------------------------|
| Alumínio (Al) | Folhas | $(0,02-13,0) \times 10^3$ | $(0,05-27,0) \times 10^3$ |
| | Infusões | 2,6-42,5 | 2,6-63,3 |
| Cálcio (Ca) | Folhas | $\text{ND}-3,70 \times 10^4$ | $\text{ND}-4,60 \times 10^4$ |
| | Infusões | $\text{ND}-23,2$ | $\text{ND}-17,0$ |
| Potássio (K) | Folhas | $(0,257-2,62) \times 10^5$ | $(0,80-2,87) \times 10^4$ |
| | Infusões | 0,2-100 | 0,3-90,2 |
| Magnésio (Mg) | Folhas | $(0,32-3,10) \times 10^4$ | $0,09 \times 10^3-3,40 \times 10^4$ |
| | Infusões | 0,87-48,8 | 1,5-54,6 |
| Manganês (Mn) | Folhas | $12,5-7,51 \times 10^3$ | $\text{ND}-1,50 \times 10^4$ |
| | Infusões | 4,3-48,6 | 0,9-73,9 |
| Sódio (Na) | Folhas | $3,56-1,10 \times 10^4$ | $11,0-3,20 \times 10^4$ |
| | Infusões | 0,59-33,7 | 0,6-96,9 |
| Fosforo (P) | Folhas | $4,84-12,7 \times 10^3$ | $(1,36-5,57) \times 10^3$ |
| | Infusões | $\text{ND}-46,8$ | $\text{ND}-53,0$ |
| Enxofre (S) | Folhas | $(2,14-3,83) \times 10^3$ | $(2,04-3,53) \times 10^3$ |
| | Infusões | 25,0-35,0 | 25,1-30,9 |

Tabela 2. 4 – Gama de concentrações dos microelementos (Cr, Cu, Fe, Mo, Ni, Zn, Cd, As, Pb e Co) em folhas de chá ($\mu\text{g} / \text{g}$ de peso seco) e infusões (%) em chás verdes e pretos disponíveis em diversos países (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012; Karak *et al.*, 2010; Seenivasan *et al.*, 2008; Özcan *et al.*, 2008; Ansari *et al.*, 2007; Gallaher *et al.*, 2006; Ferrara *et al.*, 2001; Marcos *et al.*, 1998).

| Microelementos | Matriz | Chá verde | Chá preto |
|-----------------|----------|------------------------------|------------------------------|
| Crómio (Cr) | Folhas | $\text{ND}-58,4$ | $\text{ND}-129$ |
| | Infusões | $\text{ND}-25,0$ | $\text{ND}-67,5$ |
| Cobre (Cu) | Folhas | 0,03-270 | 0,05-602 |
| | Infusões | 2,7-54,0 | 10,3-74,8 |
| Ferro (Fe) | Folhas | $0,03-1,30 \times 10^4$ | $0,70-1,17 \times 10^4$ |
| | Infusões | 0,03-51,7 | 0,2-57,0 |
| Molibdénio (Mo) | Folhas | 162 | $\text{ND}-571$ |
| | Infusões | --- | 14,6 |
| Níquel (Ni) | Folhas | $\text{ND}-1,34 \times 10^3$ | $\text{ND}-1,96 \times 10^3$ |
| | Infusões | 4,2-100 | 0,1-100 |
| Zinco (Zn) | Folhas | 0,06-735 | $\text{ND}-1,12 \times 10^3$ |
| | Infusões | 0,02-88,8 | 0,1-78,0 |
| Cádmio (Cd) | Folhas | $\text{ND}-1,07$ | $\text{ND}-8,60$ |
| | Infusões | $\text{ND}-100$ | $\text{ND}-40,3$ |
| Arsénio (As) | Folhas | $\text{ND}-3,87$ | $\text{ND}-10,2$ |
| | Infusões | $\text{ND}-32,2$ | $\text{ND}-36,8$ |
| Chumbo (Pb) | Folhas | $\text{ND}-92,7$ | $\text{ND}-240$ |
| | Infusões | $\text{ND}-<20$ | $\text{ND}-58,6$ |
| Cobalto (Co) | Folhas | $\text{ND}-3,56$ | $\text{ND}-17,4$ |
| | Infusões | 0,9-69,8 | 5,0-56,3 |

A determinação de elementos essenciais em chá é importante sob dois aspectos: para avaliar o seu valor nutricional e para protecção contra quaisquer prováveis efeitos colaterais.

2.1.4 - Efeito do método de infusão na composição (tempo, razão chá/água, temperatura)

Os nutrientes extraídos das folhas de chá, nomeadamente os compostos fenólicos, podem sofrer alterações durante todo o processo da sua preparação e, por conseguinte, é importante ter em conta os parâmetros como da temperatura e o tempo de infusão (Riehle *et al.*, 2013).

O teor de flavonóides de uma chávena de chá depende de dois factores principais: a composição das folhas de chá verde em si, e as características de fermentação. O chá em si é influenciado pelo tipo de chá e o método de processamento. A actividade antioxidante depende, em grande parte, da quantidade total de catequinas e da sua presença relativa (El-Shahawi *et al.*, 2012).

Alguns estudos sugerem que existem diferenças significativas na composição química de chás verdes, comercialmente disponíveis na Europa, e que a eficiência de extracção de compostos bioactivos a partir do chá verde depende das condições de extracção. A eficiência máxima de extracção foi alcançada durante a extracção aquosa a 80 ° C (Komes *et al.*, 2010). Esta eficiência de extracção depende também do tempo de extracção e dos solventes utilizados. A extracção de catequinas do chá verde foi significativamente afectada pela forma (ensacado ou a granel) do chá (Rusak *et al.*, 2008).

Estudos realizados por Samaniego-Sánchez e colaboradores (2011) mostram que a temperatura da água e o tempo de infusão podem influenciar fortemente os níveis de polifenóis totais e a capacidade antioxidante de chá verde. Temperaturas de 70-80 °C, juntamente com tempos de infusão de 3-5 min produzem um maior efeito, mas aos 90 °C a extracção foi mais rápida e mais eficaz. No entanto, a infusão prolongada a esta temperatura pode fazer com que haja perda de compostos fenólicos e, consequentemente, da capacidade antioxidante. Factores tais como agitação e dosagem não parecem ter muita influência. Estes investigadores verificaram também que as infusões de chá verde puro têm propriedades antioxidantes mais elevadas do que as misturas de chá verde com ervas aromáticas e frutas (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2011).

O teor de cafeína encontrado em infusões de chá é dependente das condições de infusão (temperatura da água e do tempo de infusão) e forma da folha, mas independente da variedade e tipo de chá. Após uma infusão durante mais de 15 min, a taxa de dissolução de cafeína torna-se mais lenta e a concentração é essencialmente constante (Suteerapataranon *et al.*, 2009).

Foi feito um estudo da influência do tempo de infusão sobre a quantidade de catequinas e cafeína e os resultados mostraram que aumento do tempo de infusão de folhas de chá verde em água fervida (5-30 minutos) levou a um aumento do conteúdo médio de polifenóis nas infusões (El-Shahawi *et al.*, 2012).

A eficiência de extracção de catequinas do chá verde foi significativamente afectada pela forma (ensacado ou a granel) dos chás usados. Verificou-se que a extracção destes compostos a partir de folhas soltas de chá verde era mais eficaz do que a extracção a partir de folhas de chás ensacados (Rusak *et al.*, 2008).

Outro estudo mostrou que, em amostras de chá verde e preto, as taxas de extracção de aminoácidos diferem significativamente com o tempo. Em geral, os aminoácidos hidrofílicos são extraídos para a infusão mais rapidamente do que os aminoácidos hidrofóbicos. A teína corresponde a cerca de 30% do total de aminoácidos livres em infusões de chá após 15 min de infusão (Kocadagli *et al.*, 2013).

Em relação ao alumínio, cobre e manganês Mehra e colaboradores (2007) mostraram que a solubilidade destes metais, em infusões de 2,5 e 10 minutos em água a ferver, foi mais elevada na primeira infusão, seguida pela segunda e terceira infusões em ordem decrescente (Mehra *et al.*, 2007).

Noutro estudo verificou-se que aumentando o volume de preparação da bebida, sem alteração da razão chá/água, se aumentou a eficiência da extracção dos bioactivos, talvez devido ao facto de que o arrefecimento de volumes maiores é mais demorado do que o arrefecimento de volumes menores (Nishiyama *et al.*, 2010).

2.1.4.1 - Efeito da água na composição do chá

Para verificar a influência da água na composição do chá foi feito um estudo em que se utilizaram diferentes tipos de água e folhas do chá de diferentes origens. Determinou-se o teor de alumínio total, as concentrações de cálcio, carbono orgânico total e teor de polifenóis totais e procuraram-se correlações com a origem das folhas de chá, o seu tamanho, o facto de serem folhas quebradas ou inteiras, e também com a composição mineral da água utilizada na preparação do chá. Verificou-se que quanto maior for a mineralização da água, menor será o rendimento de extracção de matéria orgânica (carbono orgânico total e de polifenóis totais) e alumínio. Isto pode ser devido à absorção de cálcio pelas folhas. O cálcio presente em águas minerais pode ser complexado pelas pectinas presentes nas paredes celulares, o que conduz a uma diminuição na eficiência da extracção (Mossion *et al.*, 2008).

Noutro estudo foram utilizadas várias águas (água da torneira, água de carvão activado adsorvido, água desionizada, água destilada, água de osmose inversa e água ultra-pura) e verificou-se que existiam diferenças significativas na taxa de rendimento de extracção no conteúdo de polifenóis, catequinas, cafeína, chumbo, cobre e flúor. Verificou-se que a água desionizada apresentou uma taxa elevada de rendimento com os polifenóis, mas baixa com cafeína; a água destilada apresentava maior conteúdo de catequinas não-éster e a água de carvão activado adsorvido maiores concentrações das catequinas éster. O conteúdo de cobre e chumbo em extractos de chá verde foram altamente correlacionados com os da água testada. Os extractos de chá verde preparados com água de osmose inversa exibiam a actividade antioxidante mais elevada. Neste estudo verificou-se ainda uma influência marcada da qualidade da água nas concentrações de metais pesados (Danrong *et al.*, 2009).

Para a preparação das infusões de chás ou outras plantas, a escolha do agente de extracção é importante. A utilização de água com um grau elevado de dureza total, devido à reacção dos polifenóis com os iões como Ca^{2+} e Mg^{2+} , permanecerá um menor teor de compostos fenólicos em solução e a capacidade antioxidante pode ser significativamente diminuída (Danrong *et al.*, 2009; Riehle *et al.*, 2013).

Noutro estudo pretendeu-se avaliar a influência das características da água, além de outros factores, no teor de catequinas, ácido gálico e cafeína presentes numa infusão de chá verde dos Açores. Foi verificado que o tipo de água usado para preparar as infusões deste chá revelou grande importância. Os teores de catequinas com maior poder antioxidante (galato de epigallocatequina, epigallocatequina e galato de epicatequina) sofreram um aumento com a diminuição do valor de pH da água e o aumento de tempo de infusão. Para os teores de ácido gálico, teofilina e cafeína não foram encontradas correlações entre os níveis presentes nas infusões e o pH da água (Petisca *et al.*, 2009).

O objectivo deste estudo foi determinar o conteúdo mineral de dezanove tipos de chás verdes e pretos dos Açores, respectivamente 3 e 5 variedades.

Esta análise compreende todas as variedades de chá “Gorreana” (verdes e pretos) e uma das variedades do chá “Porto Formoso” que só produz chá preto.

A selecção do tempo de infusão a utilizar no estudo da composição mineral (5 min e 15 min) baseou-se nos procedimentos mais comuns de preparação do chá e corresponde à gama de tempo de infusão que, de acordo com a literatura, mais influencia a composição do chá.

Outra componente fundamental do valor nutricional do chá é o teor de compostos fenólicos totais, compostos que representam uma fracção significativa dos componentes orgânicos do chá e que influenciam decisivamente a sua actividade antioxidante. Estudos recentes destacam a influência destes componentes fenólicos na absorção dos restantes nutrientes durante o processo digestivo nomeadamente a nível da absorção de carboidratos.

2.2 - Parte Experimental

2.2.1 – Amostragem

As amostras de chás verdes e pretos, incluídas neste trabalho, são apresentadas na Tabela 2.5. Os dezanove tipos de chás verdes e pretos (3 variedades de chá verde e 5 variedades de chá preto) dos Açores e onze chás importados (5 chás verdes e 6 chás pretos) foram adquiridos nos Açores e em Portugal Continental.

Tabela 2. 5 – Identificação dos chás verdes e pretos estudados sob a forma de folhas secas ou infusões.

| Tipo de Infusão | Marca | Variedade | Apresentação | Composição | Código |
|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|--|---------------|
| Chá Verde | “Gorreana” | “Tradicional” | Folha enrolada | 100% chá verde | VA1 |
| | | “Encosta de Bruma” | Folhas | 100% chá | VA2 |
| | | “Hysson” | Folhas | 100% chá | VA3 |
| | “Tetley” | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá verde | VC1 |
| | “Tley” | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá verde | VC2 |
| | “Salutem” | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá verde | VC3 |
| | | ----- | Triturado, saquetas | 95% chá verde + 5% raízes de ginseng | VC4 |
| | “Lipton” | ----- | Triturado, saquetas | 88.7% Chá verde + 7.2% folhas de menta + 4.1% aroma de menta | VC5 |
| Chá preto | “Gorreana” | “Orange Pekoe” | Folhas | 100% chá | PA1 |
| | | “Pekoe” | Folhas | 100% chá | PA2 |
| | | “Broken Leaf” | Folhas | 100% chá | PA3 |
| | | “Moinha” | Folhas | 100% chá | PA4 |
| | “Porto Formoso” | “Pekoe” | Folhas | 100% chá | PA5 |
| | “Li Cungo” | ----- | Triturado | 100% chá preto (Moçambique) | PC1 |
| | “Whiteeard of Chelsea” | “English Breakfast” | Triturado | 100% chá ceilão (Sri Lanka) | PC2 |
| | “Lipton” | “Earl Grey” | Triturado, saquetas | 89.3% Chá preto + 10.2% Aroma natural de bergamota + 0.5% pétalas (bluef e jasmim) | PC3 |
| | “Tetley” | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá preto | PC4 |
| | “Lipton” | ----- | Triturado, saquetas | 86.6% chá preto + 10.7% aromas + 2.7% casca de limão | PC5 |
| | “Tley” | ----- | Triturado, saquetas | 50% canela + 40% chá preto + 8% aroma de canela + 2% aroma de laranja | PC6 |

As amostras adquiridas foram armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e da humidade.

2.2.2 – Preparação das infusões (5 min, 15 min)

Os chás foram preparados colocando 0,5 g de chá ou tisana em 50,0 mL de água destilada fervente (100 °C). O tempo de infusão foi de 5 e 15 min, sem agitação. Após este tempo filtrou-se a infusão obtida com papel de filtro.

Os extractos obtidos foram armazenados num congelador (Eurofront, Uruguai, Teixeira e Ramalho, SA) a -20°C, para posterior análise.

2.2.3 – Preparação do extracto aquoso (60 min)

Os extractos aquosos foram preparados de acordo com o método oficial 920.104 do AOAC (1990) colocando 2,0 g de chá em 200,0 mL de água destilada. Esta solução foi colocada a ferver durante 1 hora com refluxo. Após este tempo filtrou-se a infusão obtida com papel de filtro.

Os extractos obtidos foram armazenados num congelador (Eurofront, Uruguai, Teixeira e Ramalho, SA) a -20°C, para posterior análise.

2.2.4 – Determinação do teor de humidade nas folhas

O teor de humidade foi determinado de acordo com o método oficial 930.15 do AOAC (1990). Assim, uma amostra de 2,0 gramas de folhas de chá foi colocada num pesa-filtros previamente tarado. Esta foi seca em estufa a 135 °C (WTC binder (0-250°C), Tuttlingen, Germany) durante duas horas. Arrefeceram-se as amostras num excicador. Quando fria, a amostra foi pesada novamente.

2.2.5 - Determinação do extracto seco das infusões

No caso das infusões, os 250 mL obtidos da infusão foram evaporados até à secura. O resíduo obtido foi colocado em estufa a 135 °C (WTC binder (0-250°C), Tuttlingen, Germany) durante duas horas. Arrefeceram-se as amostras num excicador. Quando fria, a amostra foi pesada (Método 930.15 do AOAC (1990)).

2.2.6 - Determinação de cinzas

O teor de cinzas foi determinado de acordo com o método oficial 942.05 do AOAC (1990). Foram determinadas as cinzas quer das folhas de chá, quer das suas infusões.

A primeira fase desta determinação é a incineração das amostras em mufla (Heraus-electronic, Germany) durante 2 horas, a 550°C. No caso das folhas de chá foram utilizadas 1,00 g de folha de chá e no caso das infusões, o resíduo obtido (extracto seco) foi incinerada.

Após as 2 horas retiram-se as cápsulas da mufla e colocam-se num excicador, e depois de arrefecidas foram pesadas numa balança analítica (Mettler Toledo AB204, Suíça).

2.2.7 - Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenólicos totais das folhas e das infusões de chá foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Amostras de 500 µL do chá (filtrado) foram transferidas para tubos de ensaio, seguidas da adição de 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) para promoção da oxidação das infusões e, passados 2 minutos, o meio foi neutralizado pela adição de 9,0 mL de uma solução com carbonato de sódio (PA-ACS-ISO, Panreac Química SA (Barcelona, Spain)) a 2,0% (m/v). Após 30 minutos de reacção no escuro e à temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorvâncias a 765 nm, utilizando-se um espectrofotómetro UV-Vis (Pharmacia,

Novaspec[®] II, Biochrom, England). O branco foi preparado da mesma forma, substituindo-se a solução-amostra por água destilada. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g de chá seco para este teor nas folhas e chá e em mg de ácido gálico/L de infusão.

2.2.8 - Determinação dos teores de fósforo e azoto das folhas

Para se fazer a determinação do fósforo e do azoto foi necessário proceder à digestão das amostras. Este procedimento foi efectuado através de uma adaptação do método para determinação de azoto total em fertilizantes (método 955.04 do AOAC (1990).

Colocou-se cerca de 1,0 g de amostra, pesado rigorosamente, num tubo de digestão. Adicionaram-se 10,0 mL de ácido sulfúrico (97%, Merck, Darmstadt, Germany) e uma porção de mistura catalisadora (100 g de sulfato de potássio (Panreac) e 1g de selénio negro em pó (Riedel-de-Hien, Suíça)) e reguladores de ebulição. Levou-se a mistura a aquecer num digestor a 360°C até a amostra ficar transparente. A solução assim obtida é transferida para um balão volumétrico de 100 mL, já com cerca de 50 mL de água destilada, que foi aferido. Filtrou-se a solução para um frasco e reservou-se até utilização.

2.2.8.1 - Determinação do teor de Ortofosfatos

O teor de ortofosfatos das folhas de chá foi determinado utilizando uma adaptação do método 931.01 do AOAC (1990).

Preparou-se uma solução redutora, juntando 250 mL de H₂SO₄ (35,0 mL H₂SO₄ (97%, Merck (Darmstadt, Germany)) em 250 mL de solução), a 75 mL de Molibdato de Amónio (10,0 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O - Puriss p.a. (Riedel-de-Hien, Suíça) - em 250 mL de água), a 2,6 g de ácido ascórbico (Anatical Reagent Grade (Fleber Chemical, UK)) e a 25 mL de tartarato de potássio e antimónio (0,75 g de K(SbO)C₄H₄O₆ · 0,5H₂O em 250 mL).

Num balão volumétrico de 100 mL juntou-se uma determinada quantidade de amostra, 8,0 mL de solução redutora previamente preparada e perfez-se o balão com água ultrapura (miliQ) (Millipore, Molsheim, France). Esperou-se 30 minutos para o desenvolvimento de cor.

Traçou-se a recta de calibração deste método utilizando soluções padrão de fosfatos (dihidrogenofosfato de potássio).

Utilizando um espectrofotómetro (Pharmacia (Novaspec[®] II), Biochrom, England) fizeram-se as leituras de absorvância a 880 nm que foram comparadas com a recta de calibração.

2.2.8.2 - Determinação do teor de Azoto Amoniacal

A determinação do azoto amoniacal das folhas de chá foi efectuada utilizando uma adaptação do método Kjeldhal (método 955.04 do AOAC (1990).

A amostra a analisar (10 mL) foi diluída por adição de 90 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado a pH>8, utilizando hidróxido de sódio 6N, e fenolftaleína como indicador.

A solução indicadora do ião NH₄⁺ foi preparada por mistura de 100 mL de solução indicadora de vermelho de metilo (0,2 mL de vermelho de metilo (indicador) – Merck (Darmstadt, Germany) – em 100 mL de etanol - Puro, José Manuel Gomes dos Santos, Lda) e 50 mL de solução indicadora de azul de metilo (0,1 g de azul de metilo - Panreac Química SA (Barcelona, Spain) – em 50 mL de etanol - Puro, José Manuel Gomes dos Santos, Lda).

A solução de recolha foi preparada por diluição de 0,5 mL de solução indicadora do ião NH₄⁺, em 50 mL de solução aquosa de ácido bórico (20,0 g de ácido bórico - Analytical Reagent Grade, Fisher Scientific, Leicestershire, UK dissolvido a quente em 1000 mL água).

Para determinação do teor de azoto amoniacal, colocou-se no destilador (Kjeltec System 1002 Distilling Unit, Tecator, Hoganas, Sweden) a solução da amostra a analisar em tubo de vidro próprio e a solução de recolha no erlenmeyer em que foi preparada. Deixou-se destilar até que o volume de solução no erlenmeyer de recolha atinja os 200 mL. A cor verde da solução de recolha indica a presença de azoto amoniacal.

Para determinação da concentração de NH_3 , titulou-se a solução de recolha com ácido sulfúrico, 0,02N (0,55 mL de H_2SO_4 (97%, Merck (Darmstadt, Germany)) aferido a 1000mL solução), até a solução apresentar cor roxa.

2.2.9 - Determinação da composição mineral das folhas de chá e das infusões

A cinza obtida anteriormente foi dissolvida, a quente, utilizando soluções de ácido nítrico - HNO_3 (65%, PA-ISO, Panreac); adicionaram-se sucessivamente 2 x 10 ml HNO_3 (1:1) e 10 mL de HNO_3 (3,25 N), tendo-se evaporado até à secura as soluções resultantes das duas primeiras adições. Quando fria, filtrou-se a solução final e aferiu-se a um volume final de 100 mL com água miliQ (ultrapura) (Millipore, Molsheim, France).

O teor de metais foi determinado de acordo com o método oficial 975.03 do AOAC (1990).

Para cada amostra foram determinados os metais Na, Mg, Al, Ca, K, Zn e Cu, e por espectrofotometria de absorção atômica à chama (Analytik jena Zeenit 700, Jena, Germany). Foram utilizadas lâmpadas de Na, Mg, K, Al e Ca (Analytikjena, Jena, Germany) e Cu e Zn (UNICAM Thermo Scientific, Waltham, EUA).

Na determinação de Na, Mg, K, Cu e Zn foi utilizada chama ar/acetileno. Para Al e Ca foi usada chama acetileno/óxido nítrico.

Os parâmetros instrumentais estabelecidos para a determinação destes metais foram os seguintes:

| Parâmetros | Na | Mg | Al | K | Ca | Cu | Zn |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| λ (nm) | 589.0 | 285.2 | 309.3 | 766.5 | 422.7 | 324.8 | 213.9 |
| Corrente da lâmpada (mA) | 8 | 6 | 10 | 8 | 6 | 5 | 10 |

Para determinar a gama linear foram construídas curvas de calibração com concentrações crescentes das soluções de referência. As soluções padrão utilizadas foram obtidas através da diluição sucessiva de soluções de *stock* 1000 mg L^{-1} (Merck, Darmstadt, Germany). Analisaram-se os resultados pelo cálculo da linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados.

Os dados referentes à recta de calibração para a determinação dos vários metais são os seguintes:

| Factores de calibração | Na | Mg | Al | K | Ca | Cu | Zn |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Gama das soluções | 0,000- 0,560 | 0,000- 0,280 | 0,000- 5,000 | 0,000- 1,600 | 0,000- 2,000 | 0,000- 2,800 | 0,000- 1,000 |
| padrão (mg/L) | | | | | | | |

As amostras foram diluídas tendo em consideração a informação de composição mineral da literatura de forma a adequar a diluição à gama de trabalho.

Os resultados foram expressos em mg de metal /Kg de chá seco para o teor mineral nas folhas e em mg de metal/L de infusão para as infusões de 5 e 15 minutos.

2.2.10 – Tratamento estatístico

As análises foram efectuadas em duplicado e os resultados obtidos foram expressos como a média e o desvio padrão.

O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação foi calculado como a razão entre o desvio padrão e a média e expresso em percentagem.

Os chás incluídos neste trabalho foram agrupados em função do tipo de chá, presença de aditivos e origem geográfica, e os diferentes grupos homogéneos foram comparados entre si quanto às variáveis em estudo.

A análise estatística foi realizada usando SPSS ® 19.0 e os módulos de tratamento estatístico do *software* Excel. Foi efectuada uma análise de variância (ANOVA) para determinar se existem diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$). O teste de Tukey foi utilizado para efectuar comparações múltiplas entre pares de médias de forma a identificar quais as amostras que são significativamente diferentes.

2.3 – Apresentação e Discussão de Resultados

Neste capítulo apresentam-se os resultados relativos ao conteúdo mineral das folhas de chá seco (inteiras ou trituradas, dependendo da formulação comercial) e o seu teor de fósforo e de azoto de forma a avaliar o potencial nutritivo destas folhas, e a transferência destes componentes das folhas para as infusões.

O teor de compostos fenólicos totais das folhas de chá foi também determinado, após extracção destes componentes com um solvente apropriado, uma vez que o teste requer que os compostos fenólicos se encontrem em solução e não numa matriz sólida.

Avaliou-se ainda a composição mineral e teor de compostos fenólicos totais de 19 infusões de folhas, de chá obtidas por infusão durante 5 minutos e 15 minutos, o que corresponde a um total de 38 amostras.

Foi feita ainda a avaliação do teor de compostos fenólicos totais em 19 extractos aquosos preparados a partir das folhas de chá seco.

2.3.1 – Estudo da influência de parâmetros experimentais

Antes de aplicar os métodos analíticos seleccionados, à totalidade das amostras incluídas neste estudo, efectuaram-se alguns estudos prévios de forma a otimizar os parâmetros operacionais de cada metodologia às características da matriz em estudo. Os parâmetros seleccionados foram as condições da reacção de Folin-Ciocalteu, a influência do tempo de infusão dos chás no seu teor de compostos fenólicos totais e a influência do solvente de extracção na avaliação de fenólicos totais em folhas de chá.

2.3.1.1 – Optimização de parâmetros da reacção de Folin-Ciocalteu - Variação do tempo de reacção no escuro e influência da centrifugação

A amostra utilizada nestes testes foi uma infusão de chá verde “Gorreana”, folha enrolada (VA1), com um tempo de infusão de 5 minutos e uma razão chá:água de 1:500. Desta forma pretende-se também avaliar o comportamento desta matriz em termos dos seus componentes reactivos e eventuais interferentes, no que respeita à reacção de Folin-Ciocalteu.

A influência do tempo de incubação no escuro (tempo de reacção) nos resultados da reacção de Folin-Ciocalteu foi avaliada entre 10 min e 120 minutos. Assim, repetiram-se os procedimentos descritos para este método variando apenas o tempo de reacção no escuro. Por determinação dos fenólicos totais obtiveram-se os seguintes resultados:

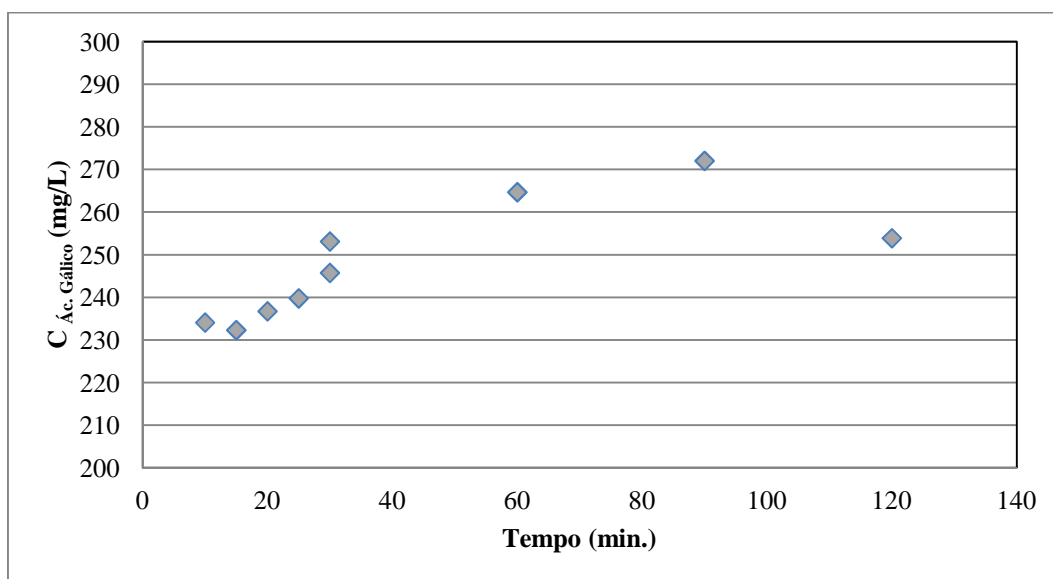


Figura 2. 1 – Variação do teor de fenólicos totais em função do tempo de incubação, no escuro, da reacção de Folin- Ciocalteu.

Em face dos resultados obtidos seleccionou-se o tempo de reacção de 30 minutos para os ensaios subsequentes, pois considerou-se que a reacção estava próxima do estado de equilíbrio e não obrigava a períodos de incubação muito longos.

A presença de compostos precipitados durante o teste de Folin-Ciocalteu ou de partículas de chá em suspensão podem afectar a determinação da absorvância. Assim repetiu-se o teste de Folin-Ciocalteu, utilizando tempos de reacção entre 30 minutos e 120 minutos, mas efectuou-se a centrifugação das soluções de teste imediatamente antes de se proceder à determinação da sua absorvância a 765 nm. Os resultados obtidos nos testes efectuados com centrifugação foram 1,1% a 10,7% superiores aos testes sem centrifugação, independentemente do tempo de incubação. Assim considerou-se que esta diferença pode ser atribuída a variações experimentais e que a sua dimensão não justificava a inclusão da operação de centrifugação.

2.3.1.2 – Influência do Tempo de infusão no teor de fenólicos totais

A influência do tempo de infusão no teor de compostos fenólicos totais foi estudada para os 7 chás “Gorreana” (3 verdes e 4 pretos). Os chás foram preparados com uma razão chá:água de 1:500 e testaram-se os tempos de infusão de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Cada infusão assim obtida foi testada quanto ao teor de compostos fenólicos totais utilizando as condições acima seleccionadas. Assim, repetiram-se os procedimentos descritos para este método variando apenas o tempo de infusão na preparação do chá (Figura 2.2).

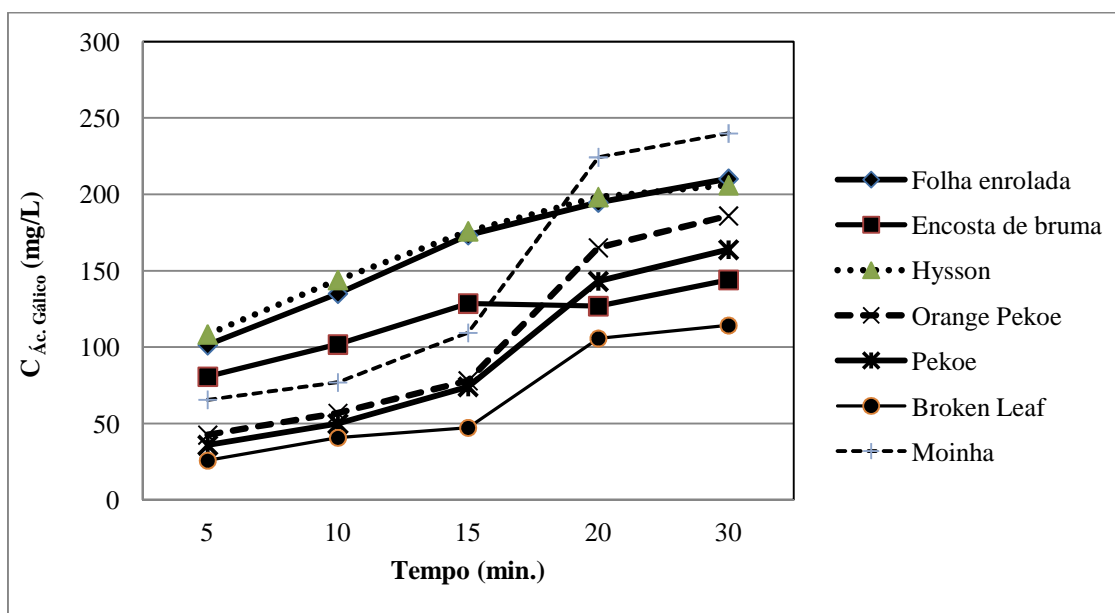


Figura 2. 2 – Evolução da concentração dos fenólicos totais, expresso em mg equivalentes de ácido gálico por litro de chá, ao longo do tempo (entre os 5 e os 30 minutos).

Obteve-se um aumento do teor de fenólicos totais em função do tempo de infusão, reflectindo a cinética de extracção destes compostos pela água quente. No caso dos chás verdes (“Folha Enrolada”, “Encosta da Bruma” e “Hysson”) esse aumento é regular em todos os tempos testados mas parece aproximar-se do equilíbrio aos 30 minutos. No caso dos chás pretos também se verifica uma tendência de equilíbrio aos 30 minutos mas regista-se um aumento importante do teor de fenólicos totais quando o tempo de infusão aumenta de 15 para 30 minutos. Os chás pretos apresentam teores de compostos fenólicos totais significativamente inferiores aos dos chás verdes para tempos de infusão entre 5 a 15 minutos. Estes compostos fenólicos, que são extraídos do chá preto quando o tempo de infusão excede os 15 minutos, poderão no entanto ter um impacto negativo na percepção sensorial da infusão, conferindo-lhe um sabor muito adstringente. As infusões de chá verde “Hysson” apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos para tempos de infusão até 15 minutos, enquanto as infusões de chá preto “Moinha” apresentaram os maiores teores de fenólicos totais nas infusões de 20 e 30 minutos. Estes dois chás apresentam a menor granulometria quando comparados com os restantes chás verdes e pretos “Gorreana” o que poderá explicar a maior facilidade na extracção de compostos fenólicos.

Assim optou-se por estudar, para todas as restantes amostras, infusões de 5 e de 15 minutos pois são os tempos de infusão mais próximos da situação comum de utilização do chá, que permitem observar alguma variação no teor de compostos fenólicos extraídos, mas preservam diferenças fundamentais entre os diferentes grupos de amostras nomeadamente entre chás verdes e chás pretos.

2.3.1.3 - Repetibilidade do método

As amostras de chá compostas por folhas não moídas como é o caso do chá “Gorreana – Folha Enrolada” apresentam maior heterogeneidade, devido a factores como o tamanho da folha ou a razão entre folhas e pedúnculos, o que poderá contribuir para uma maior variabilidade na avaliação do teor de compostos fenólicos totais.

Utilizando as condições seleccionadas avaliou-se a repetibilidade do método de determinação dos compostos fenólicos totais para uma amostra de chá “Gorreana – Folha Enrolada”, com um tempo de infusão de 5 minutos. Considerou-se que o tempo de infusão mais curto seria aquele que poderia estar afectado de maior variabilidade devido a efeito de matriz e limitações cinéticas.

Efectuaram-se 10 infusões independentes deste chá com uma razão chá:água de 1:500 sendo cada uma delas submetida às condições do teste de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 2.6.

Tabela 2. 6 – Teor de compostos fenólicos totais para diferentes amostras de chá “Gorreana – Folha Enrolada” (n=10), avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu e expresso em mg equivalentes de ácido gálico (mg/L).

| Replicadas (n=10) | C (ác. gálico) equivalentes mg/L |
|------------------------------|---|
| 1 | 209,6 |
| 2 | 209,0 |
| 3 | 203,8 |
| 4 | 209,2 |
| 5 | 210,8 |
| 6 | 206,8 |
| 7 | 211,9 |
| 8 | 206,6 |
| 9 | 210,8 |
| 10 | 209,4 |
| Média | 208,8 |
| Desvio Padrão | 2,30 |
| Desvio Relativo (%) | 1,10 |

O método apresentou uma boa repetibilidade tendo-se obtido um desvio padrão relativo de 1,1%. Este resultado permite concluir que nas condições seleccionadas o efeito de matriz e, nomeadamente diferenças na granulometria das amostras ou outros aspectos de composição não afectaram de forma importante a determinação de compostos fenólicos para as infusões de 5 minutos.

Procurou-se verificar se esta repetibilidade se mantinha para tempos de infusão superiores e se o mesmo ocorria para diferentes amostras de chá. Assim avaliou-se a repetibilidade do teste de Folin-Ciocalteu para tempos de infusão de 15 e de 30 minutos, para dois chás distintos: o chá “Gorreana – Folha Enrolada” e o chá “Verde Menta” (Tabela 2.7). Prepararam-se infusões diferentes para o mesmo tempo de infusão e para o mesmo tipo de chá. Os chás foram preparados com uma razão chá:água de 1:100.

Tabela 2. 7 - Teor de compostos fenólicos totais para diferentes amostras de chá “Gorreana – Folha Enrolada” e o chá “Verde Menta” (n=5), avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu e expresso em mg equivalentes de ácido gálico (mg/L).

| Replicadas | Gorreana - Folha Enrolada | | Verde Menta (Lipton) | |
|-----------------|---------------------------|--------|----------------------|---------|
| | Ác Gálico (mg/L) | | Ác Gálico (mg/L) | |
| | 15 min | 30 min | 15 min | 30 min |
| 1 | 728,02 | 887,23 | 1031,54 | 1117,42 |
| 2 | 748,12 | 855,88 | 985,12 | 1013,97 |
| 3 | 792,24 | 946,65 | 951,56 | 1000,51 |
| 4 | 725,88 | 862,68 | 953,44 | 1006,72 |
| 5 | 728,02 | 869,45 | 981,07 | 1002,73 |
| Média | 744,46 | 884,38 | 980,55 | 1028,27 |
| Desvio Padrão | 28,207 | 36,714 | 32,390 | 50,100 |
| Desvio relativo | 3,789 | 4,151 | 3,303 | 4,872 |

Pode dizer-se que existe reprodutibilidade quando se prepara o mesmo chá em alturas diferentes, independentemente do tempo de infusão, pois os resultados obtidos para a reacção Folin-Ciocalteu são semelhantes, apresentando um erro relativo que não excede os 5%.

2.3.1.4 – Influência do Solvente na extracção dos fenólicos totais

A avaliação do teor de compostos fenólicos totais no chá seco obriga a utilizar um método de extracção apropriado, de forma a colocar estes compostos numa forma disponível à sua quantificação pelo método de Folin-Ciocalteu. Apesar de a natureza dos solventes apropriados à extracção de compostos fenólicos ser largamente conhecida (Turkmen *et al.*, 2006) foi feito um estudo da influência do solvente na extracção dos fenólicos totais. Assim, repetiram-se os procedimentos descritos para este método variando apenas o solvente. Por determinação dos fenólicos totais obtiveram-se os seguintes resultados (Figura 2.3):

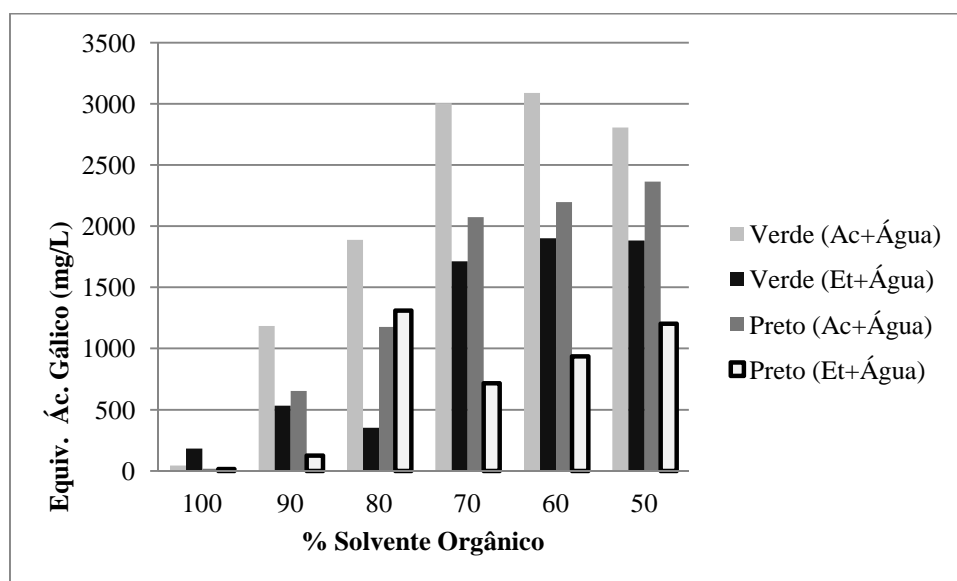


Figura 2. 3 - Teor de compostos fenólicos totais para diferentes amostras de chá “Gorreana – Encosta da Bruma” (chá verde) e “Pekoe” (chá preto) extraídos por diferentes solventes (n=2) e avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu e expresso em mg equivalentes de ácido gálico (mg/L)

Dados os resultados obtidos optou-se por preparar todos os extractos de chá utilizando como solvente 50% acetona+50% água, uma vez que este solvente, para os tipos de chá verde e preto, apresenta os valores mais elevados.

Para este estudo, e após a optimização dos métodos, seleccionaram-se as seguintes condições de ensaio:

- Tempos de infusão de 5 e 15 minutos - o tempo de 5 minutos é o tempo de infusão de chá aconselhado pelos produtores de chá (3 a 5 minutos); o tempo de infusão de 15 minutos foi seleccionado por ser um tempo de infusão utilizado pelos consumidores e por permitir testar uma maior taxa de extracção de compostos fenólicos.
- Tempo da reacção do reagente Folin-Ciocalteu de 30 minutos – o tempo a partir do qual se considerou que a reacção entrou numa fase de menor velocidade, ou seja, atingiu um estado quase estacionário.
- Não utilização de centrifugação na mistura reaccional do teste de Folin-Ciocalteu - uma vez que os resultados obtidos com e sem centrifugação foram semelhantes. Além do mais é também o método de separação da infusão das folhas de chá utilizado pelos consumidores.
- Extracção dos fenólicos totais das folhas de chá com acetona a 50% (v/v) – esta composição de solvente permitiu obter uma boa extracção de compostos fenólicos totais para a totalidade dos chás considerados.

2.3.2 - Caracterização das folhas

As folhas de chá verde e preto foram estudadas para determinar o teor de humidade e de cinzas, expressos em % (g/g folhas de chá), o conteúdo de fenólicos totais, expresso como equivalentes de ácido gálico (mg/g chá seco), o teor de fósforo, expresso em g/g chá seco e o teor de azoto, expresso em g/100 g chá seco.

As folhas de chá verde e preto foram também estudadas no sentido de determinar o conteúdo mineral. Por absorção atómica por determinação à chama obtiveram-se os seguintes resultados, expressos mg/Kg peso seco.

2.3.2.1 - Teor de Humidade

A humidade é um factor importante na qualidade dos alimentos, na preservação e na resistência à deterioração. A determinação do teor de humidade é também importante para a determinação de outros parâmetros numa base uniforme, isto é, o peso seco.

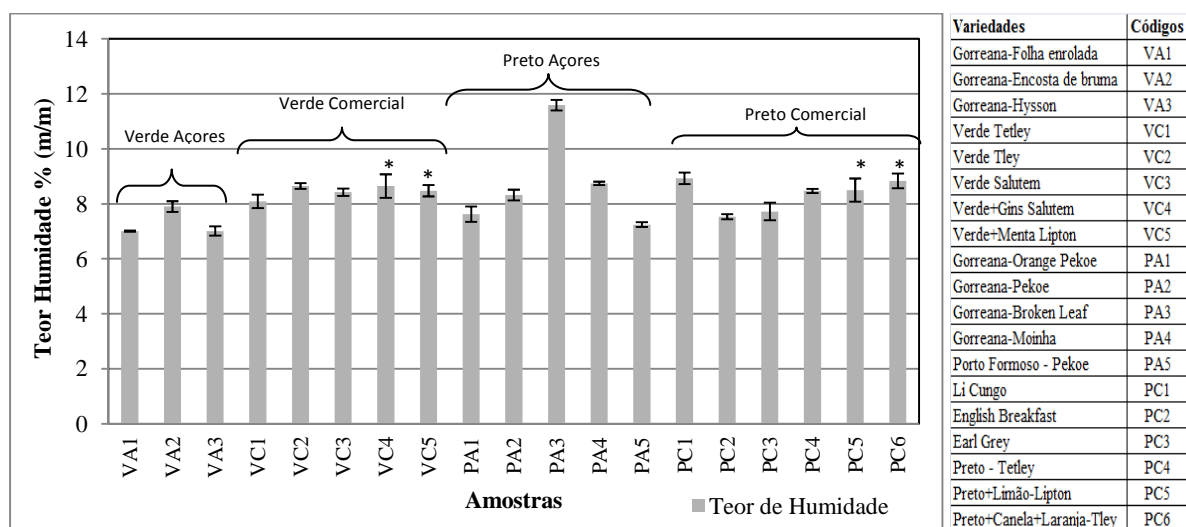


Figura 2. 4 – Teor de humidade das amostras de chá analisadas; * adicionados

No que respeita aos valores obtidos para o teor de humidade das folhas de chá verificou-se que o que apresentou o maior teor é o chá preto “Gorreana”, variedade “Broken-Leaf” (PA3), com 11,59% e o menor valor foi apresentado pelo chá verde “Gorreana Hysson” (VA3) com 7,01% (Figura 2.4).

O chá preto “Gorreana-Broken Leaf” (PA3) apresentou um teor de humidade de 11,6%, significativamente superior ($p < 0,05$) a todos os outros chás testados.

Tabela 2. 8 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de humidade dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de humidade (% m/m) | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 7,3 ^a | 8,4 ^a | 8,6 ^a | 8,7 ^a | 8,2 ^a | 8,7 ^a | 8,3 |
| Desvio Padrão | 0,5 | 0,3 | 0,1 | 1,7 | 0,7 | 0,2 | 1,0 |
| Coeficiente de Variação (%) | 7,0 | 3,4 | 1,4 | 19,7 | 8,0 | 2,7 | 12,1 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os teores de humidade das amostras de chá analisadas neste trabalho apresentaram uma média de $8,3 \pm 1,0$ % (m/m) (tabela 2.8). A comparação das médias dos teores de humidade entre os 6 grupos de chás considerados não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$); no grupo do chá preto dos Açores uma amostra (PA3 – “Gorreana-Broken Leaf”) apresentou um teor de humidade significativamente superior ao de todas as outras amostras contribuindo para um coeficiente de variação de quase 20% neste grupo específico.

Ghodake e colaboradores (Ghodake *et al.*, 2007) determinaram valores de humidade de chá, a diferentes temperaturas e diferentes humidades atmosféricas relativas, e encontraram valores de teor de humidade de chá preto entre 5 a 10% para chá preto armazenado a temperaturas entre 20° C e 40 °C e humidade atmosférica entre 10% e 45%. Os mesmos autores verificaram que o teor de humidade do chá verde era inferior ao teor de humidade do chá preto conservado em condições idênticas, apenas para temperaturas de 30°C ou superiores e as diferenças registadas foram de 1% a 1,5% (m/m). Estes autores constataram que o teor de humidade do chá é directamente proporcional à humidade ambiente e inversamente proporcional à temperatura ambiente.

O teor de humidade de 70 amostras de folhas de chá processadas artesanalmente foi avaliado por métodos espectroscópicos tendo sido encontrados valores entre 4,2% e 6,9% (m/m) (Li *et al.*, 2012).

Mohammed e colaboradores (Mohammed *et al.*, 2009) determinaram o teor de humidade de chás de diferentes proveniências geográficas e encontraram valores de teor de humidade entre 5,6% e 7,5% (m/m). Estes valores são ligeiramente inferiores aos encontrados neste trabalho, o que pode dever-se ao facto destes autores terem armazenado o chá em recipiente seco e estanque, enquanto no presente trabalho os chás foram armazenados em local seco mas não num recipiente estanque.

Outros autores determinaram o teor de humidade de chás do Paquistão tendo registado valores entre 6,09 e 7,08 % (m/m) (Imran *et al.*, 2011). Com teores próximos destes valores existe outro estudo realizado em chás adquiridos em Penang, na Malásia, que apresentam teores de $6,13 \pm 0,03\%$ para os chás verdes e de $5,45 \pm 0,13\%$ para os chás pretos (Heong *et al.*, 2011).

Outros autores determinaram valores mais elevados para o chá verde (Akande *et al.*, 2011) obtendo um valor de $13,82 \pm 0,85\%$ enquanto para os chás “Lipton”, o teor de humidade determinado foi de $10,00 \pm 0,49\%$. Para este estudo os chás foram adquiridos em Lagos, na Nigéria.

O valor médio de humidade das amostras incluídas neste estudo foi idêntico aos valores encontrados por Ghodake e colaboradores (Ghodake *et al.*, 2009) que também analisaram amostras armazenadas em equilíbrio com a humidade e temperatura ambiente.

As amostras de chá analisadas neste trabalho apresentam teores de humidade superiores aos registados para amostras de chá provenientes de regiões asiáticas (China, Paquistão), mas inferiores às registadas

pelo estudo de chás adquiridos na Nigéria, o que pode estar relacionado com a temperatura ambiente registada em Portugal por comparação com essas regiões do globo.

O teor de humidade é um parâmetro de qualidade importante em alimentos desidratados, como é o caso do chá, pois condiciona a sua duração em prateleira, à temperatura ambiente, inversamente correlacionado com a degradação destes alimentos por crescimento microbiano e/ou acção enzimática.

2.3.2.2 - Teor de Cinzas

A cinza refere-se ao resíduo inorgânico que permanece após a incineração, sendo o ponto de partida para análise do teor de minerais nas amostras. A sua composição não é necessariamente a mesma da matéria mineral presente originalmente nas folhas de chá, pois pode haver perdas por volatilização ou por alguma interacção entre os constituintes da amostra.

O maior teor de cinzas (6,96% m/m) foi apresentado pelo chá comercial preto com canela e laranja (PC6) e o menor valor (4,98%) apresentado pelo chá preto “Porto Formoso - Pekoe” (PA5) (Figura 2.5).

O chá preto comercial com canela e laranja (PC6) apresentou um teor de cinzas de 7,0%, significativamente superior ($p < 0,05$) a todos os outros chás testados, o que pode ser devido à presença da canela.

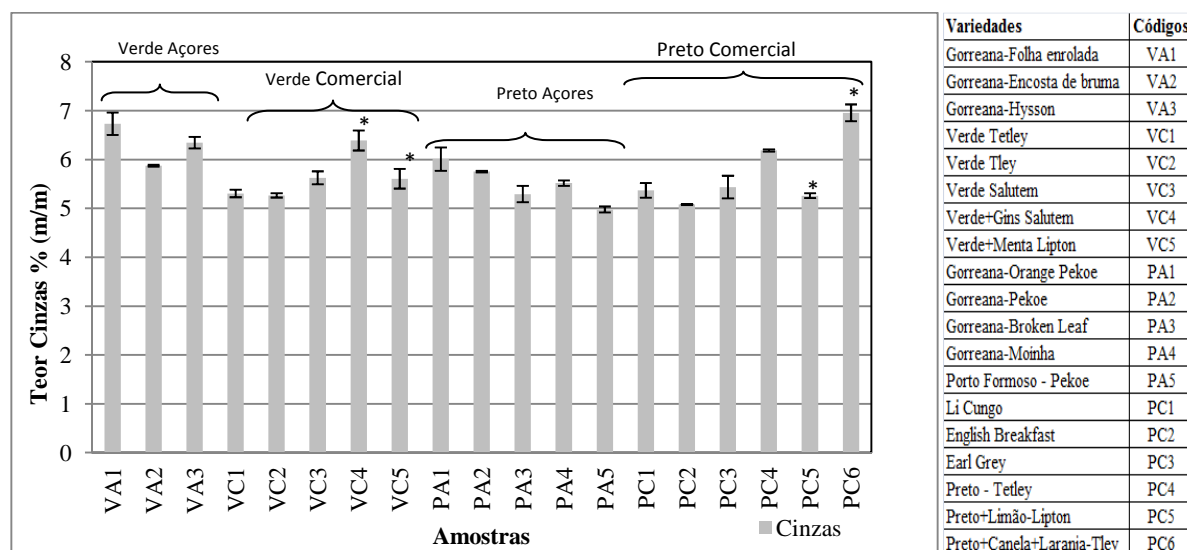


Figura 2. 5 - Teor de cinzas das amostras de chá analisadas; * adicionados

Os teores de cinzas das amostras de chá analisadas neste trabalho apresentaram uma média de $5,7 \pm 0,6$ % (m/m) (tabela 2.9). Imram e colaboradores (Imran *et al.*, 2011) determinaram valores de cinzas entre 4,2 e 5,1% para chá verde e chá preto do Paquistão. Outros autores obtiveram teores de cinzas entre 4,9 e 7,2 %, para chás de diferentes origens (Mohammed *et al.*, 2009).

Tabela 2. 9 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinzas dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Cinzas (% m/m) | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 6,3 ^a | 5,4 ^a | 6,0 ^a | 5,5 ^a | 5,5 ^a | 6,1 ^a | 5,7 |
| Desvio Padrão | 0,4 | 0,2 | 0,6 | 0,4 | 0,5 | 1,2 | 0,6 |
| Coeficiente de Variação (%) | 6,8 | 3,7 | 9,2 | 7,2 | 8,5 | 19,6 | 9,8 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Outro estudo realizado com chás adquiridos na Malásia apresenta valores médios de $5,51 \pm 0,06\%$ para os chás verdes e de $5,45 \pm 0,13\%$ para os chás pretos (Heong *et al.*, 2011).

Para o chá preto, outros estudos apresentam teores de cinzas que variam entre $4,55 \pm 0,03$ e $5,55 \pm 0,01\%$ (Serpen *et al.*, 2012) e de $4,86 \pm 0,08\%$ (Imram *et al.*, 2013).

Também no caso dos teores de cinzas (Tabela 2.9) não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os 6 grupos de chás considerados; encontrou-se um coeficiente de variação particularmente elevado no grupo do chá preto comercial adicionado (19,6%) que apresenta amostras com teores de cinzas bastante distintos.

O teor de cinzas do chá em folha reflecte a sua composição mineral, mas também pode ser encarado como um parâmetro de qualidade do seu processamento, dado que valores elevados do teor de cinzas podem corresponder a contaminações com pós, areias ou outros materiais inorgânicos.

2.3.2.3 – Teor de Fenólicos totais (Ext 50%acetona, 50% H₂O)

Pela análise dos resultados obtidos verificou-se que existe uma grande variância nos resultados obtidos. A maior quantidade de fenólicos totais, extraída das folhas de chá, foi verificada no chá verde “Ginseng” (VC4) e a menor quantidade no chá preto “Gorreana Pekoe” (PA2). Verificou-se que os chás pretos apresentam, maioritariamente, um teor inferior aos dos chás verdes, sendo que os chás dos Açores têm teores normalmente mais baixo que os comerciais (Figura 2.6).

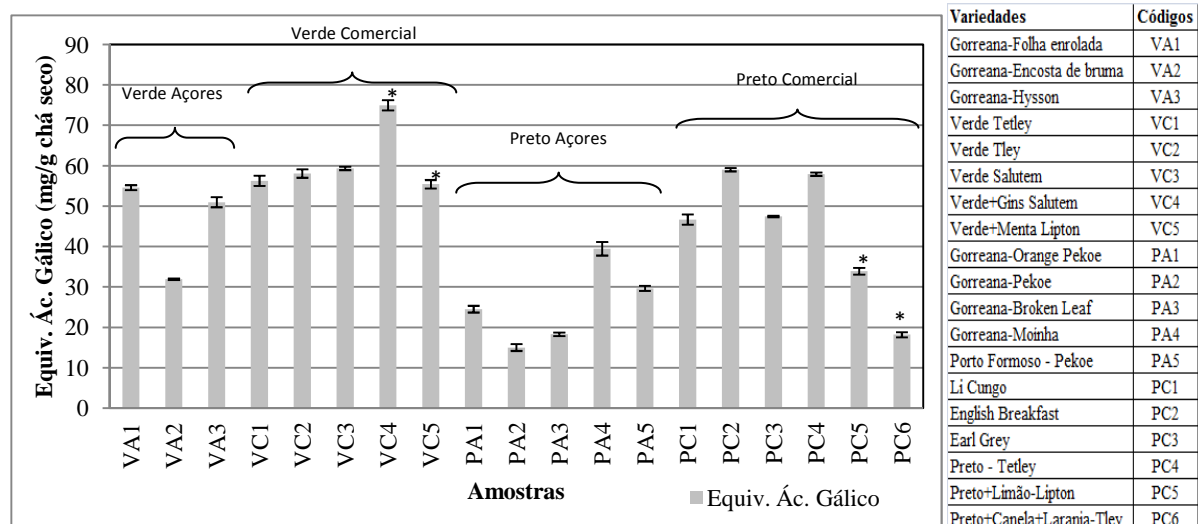


Figura 2. 6 - Teor de compostos fenólicos totais das amostras de chá analisadas; * adicionados

Este facto pode ser confirmado pelos valores constantes na Tabela 2.10. Os chás verdes dos Açores apresentam uma média dos teores de compostos fenólicos de $45,8 \pm 12,2$ mg/g de chá seco, enquanto os chás verdes comerciais simples e adicionados apresentam médias de $57,9 \pm 1,6$ mg/g de chá seco e de $65,2 \pm 13,8$ mg/g de chá seco, respectivamente. O mesmo acontece em relação aos chás pretos, em que os chás dos Açores apresentam teores de compostos fenólicos de $25,4 \pm 9,7$ mg/g de chá seco, valor ligeiramente inferior aos chás pretos adicionados ($26,0 \pm 11,1$ mg/g de chá seco) mas inferiores aos chás pretos simples ($52,8 \pm 6,6$ mg/g de chá seco).

Esta variação pode ser causada pelo facto de os chás dos Açores se apresentarem sob a forma de folhas. O único chá dos Açores que se apresenta com alguma moagem, o chá “Gorreana Moinha” (PA4), é também aquele que entre os vários chás dos Açores apresenta maior teor de compostos fenólicos (Figura 2.6).

Komes e colaboradores mostraram (Komes *et al.*, 2010) que para diversas temperaturas de preparação das infusões (60 °C, 80 °C e 100 °C), a infusão preparada a partir de chá em pó apresenta maior actividade antioxidante do que a preparada a partir do chá que se apresenta em folhas soltas.

Sendo os compostos fenólicos uns dos compostos responsáveis pela adstringência do chá, o facto dos chás dos Açores apresentarem menores teores destes compostos faz com que apresentem menor adstringência.

O chá verde VC4 apresentou um teor de compostos fenólicos totais significativamente superior a todos os outros chás analisados ($p < 0,05$). É um chá verde aditivado com ginseng, produto natural conhecido pela actividade antioxidante e elevado teor de compostos fenólicos (Chan *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). O chá que apresentou menor teor de fenólicos foi o chá preto “Gorreana Pekoe” (PA2).

Tabela 2. 10 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de compostos fenólicos dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Compostos Fenólicos (mg/g chá seco) | | | | | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 45,8 ^{ab} | 57,9 ^b | 65,2 ^b | 25,4 ^a | 52,8 ^b | 26,0 ^a | 43,8 |
| Desvio Padrão | 12,2 | 1,6 | 13,8 | 9,7 | 6,6 | 11,1 | 17,2 |
| Coeficiente de Variação (%) | 26,6 | 2,7 | 21,2 | 38,1 | 12,5 | 42,6 | 39,2 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

O teor médio de compostos fenólicos das amostras de chá analisadas neste trabalho apresentou uma média de $43,8 \pm 17,2$ mg equivalentes de ácido gálico/g de chá seco.

Os chás pretos dos Açores e pretos comerciais adicionados têm valores médios significativamente inferiores a todos os outros grupos testados, excepto os chás verdes dos Açores. Para tal contribuem os chás dos Açores, “Gorreana Pekoe” (PA2) e “Broken Leaf” (PA3) e o “Preto Canela e Laranja” (PC6) que são significativamente mais baixos que todos os chás analisados. No caso dos chás dos Açores, os chás “Gorreana Pekoe” e “Broken Leaf” são particularmente baixos, e o chá “Gorreana Pekoe” apresentou valores significativamente inferiores a todos os outros.

Os chás verdes dos Açores apresentam um valor de fenólicos intermédio entre os chás pretos dos Açores e os chás verdes comerciais, não apresentando diferenças significativas entre estes dois grupos. No entanto nesta categoria situam-se dois chás (“Gorreana Encosta da Bruma” e “Gorreana Hysson”) que apresentaram teores de fenólicos significativamente inferiores aos chás verdes comerciais. Dentro da categoria de chás comerciais adicionados distingue-se o chá adicionado com ginseng que apresenta um teor de fenólicos significativamente superior a todos os outros chás verdes e pretos.

Turkmen e colaboradores (Turkmen *et al.*, 2006) determinaram valores de teores de fenólicos, para chá preto, de $92,4 \pm 0,83$ mg equivalentes de ácido gálico/g de chá seco. A diferença verificada entre estes valores e os valores obtidos neste trabalho pode ser explicada pela forma como foram extraídos os fenólicos. Apesar do solvente utilizado ter sido um solvente aquoso com 50% de acetona, a extracção dos compostos fenólicos foi feita por extracção efectuada durante uma hora com agitação e após o processo de extracção das folhas o extracto obtido foi concentrado.

Segundo outro estudo (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006) o rendimento desta extracção de fenólicos totais com solvente aquoso com 50% de acetona foi de 33,5%, no entanto este estudo evidencia que a composição de fenólicos nos chás depende do clima, estação do ano em que as folhas de chá são apanhadas, variedade e idade das folhas.

2.3.2.4 - Teor de fósforo

O fósforo integra a adenosina trifosfato (ATP), uma das principais reservas energéticas do organismo, assim como fosfolípidos dos ácidos nucleicos, lipoproteínas e várias enzimas e metabolitos intermediários (Almeida & Afonso, 1997).

O maior teor de fósforo foi verificado nas folhas de chá preto “Gorreana Pekoe” (PA2), seguido das folhas do chá preto “Gorreana Orange Pekoe” (PA1). O chá que apresentou o menor teor de fósforo foi o chá preto comercial com canela e laranja (PC6) (Figura 2.7) com um valor significativamente inferior a todos os chás analisados neste estudo.

Os chás dos Açores à exceção do chá verde “Encosta da Bruma” (VA2) apresentaram teores de fósforo significativamente superiores a todos os outros chás ($p < 0,05$).

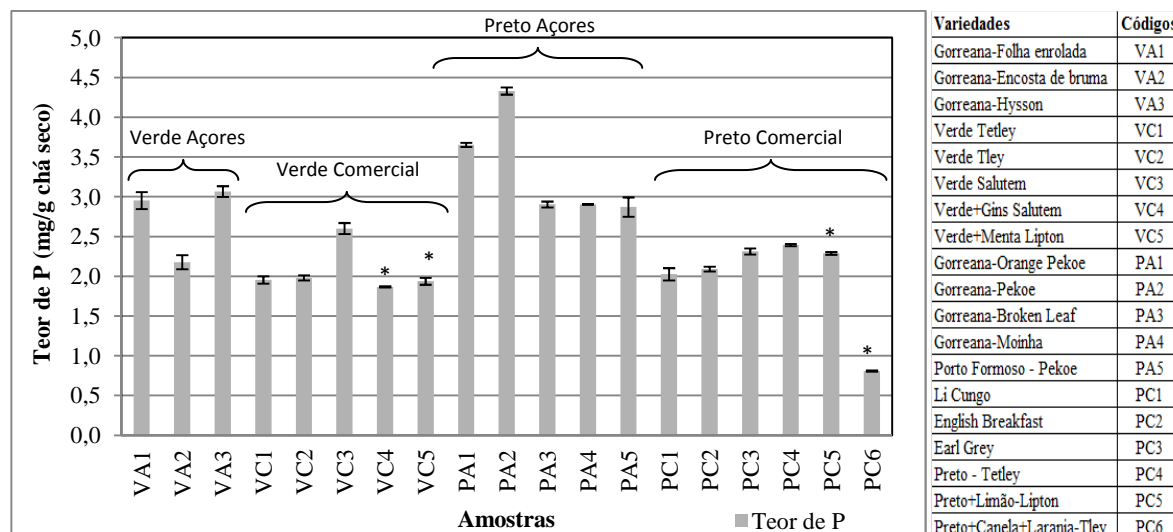


Figura 2. 7 - Teor de fósforo das amostras de chá analisadas; * adicionados

Os teores de fósforo das amostras de chá analisadas neste trabalho (Tabela 2.11) apresentaram uma média de $2,5 \pm 0,8$ mg/g chá seco, sendo 2,3 mg de P/g chá seco para o chá verde e de 2,6 mg de P/g chá seco para o chá preto.

Tabela 2. 11 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fósforo dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Fósforo (mg/g chá seco) | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 2,7 ^{ab} | 2,2 ^{ab} | 1,9 ^{ab} | 3,3 ^b | 2,2 ^{ab} | 1,6 ^a | 2,5 |
| Desvio Padrão | 0,5 | 0,4 | 0,0 | 0,6 | 0,2 | 1,0 | 0,8 |
| Coeficiente de Variação (%) | 17,7 | 16,9 | 2,6 | 19,5 | 7,8 | 67,5 | 30,6 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Observando os valores dos teores de fósforo dos chás analisados verificou-se que a classe de chá que apresentou menor ($p < 0,05$) teor de fósforo foi a do chá preto adicionado, o que se deve ao valor excepcionalmente baixo do preto “Canela Laranja” (PC6).

Os chás dos Açores verdes e pretos apresentaram maiores teores de fósforo (uma média de $2,73 \pm 0,5$ mg de P/g chá seco e $3,3 \pm 0,6$ mg de P/g chá seco, respectivamente) do que qualquer dos chás comerciais.

De facto, todos os chás dos Açores (pretos e verdes) com excepção do “Gorreana Encosta da Bruma” apresentaram teores de fósforo superiores a todos os chás comerciais. Os chás pretos “Gorreana Orange Pekoe” e “Pekoe” apresentaram teores significativamente superiores a todos os outros.

Estudos apresentados por Szymczycha-Madeja e seus colaboradores (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) apresentaram valores de fósforo para as folhas, determinados por absorção atómica, que variam entre 4,84 e 5,79 mg P/g, de chá seco para o chá verde, e de 1,36 e 5,57 mg/g de chá seco, para o chá preto. Noutro estudo (McKenzie *et al.*, 2010) foram determinados, pelo mesmo método, teores de fósforo para o chá verde (n=24) entre 1,70 mg/g de chá seco e 3,58 mg/g de chá seco, com uma média de 2,54 mg/g de chá seco. Para o chá preto (n=36) apresenta uma variação dos teores de fósforo de 1,97 mg/g de chá seco e 4,15 mg/g de chá seco, com uma média de 2,87 mg/g de chá seco. Ainda outro estudo liderado por Gallaher (Gallaher *et al.*, 2006) o teor de fósforo encontrado no chá verde autêntico foi de $4,84 \pm 0,10$ mg de P/g chá seco e para o chá verde chinês foi determinado um valor de $5,46 \pm 0,06$ mg de P/g chá seco.

Ainda noutro estudo realizado por Özcan e colaboradores (Özcan *et al.*, 2008) foram determinados teores de fósforo para chás verdes e pretos, com teores de $12,7 \pm 3,1$ mg/g de chá seco e de $2,9 \pm 0,2$ mg/g de chá seco, respectivamente.

No entanto, um estudo realizado por Malik e colaboradores (Malik *et al.*, 2008) determinou valores de fósforo bastante mais elevados dos observados neste estudo, valores de $3,58 \pm 0,043$ a $3,79 \pm 0,091$ mg de P/g chá seco para chás pretos e de valores entre $3,04 \pm 0,14$ e $4,05 \pm 0,73$ mg de P/g chá seco para os chás verdes.

A diferença observada entre os valores da literatura e os valores obtidos neste estudo pode ser possivelmente explicada pelo facto de terem sido utilizados métodos diferentes. Na literaturas as determinações serem feitas por absorção atómica e no neste estudo as determinações foram efectuadas pelo método espectrofotométrico.

No caso dos teores de fósforo (Tabela 2.6) foram encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo de chás pretos comerciais aditivados e os chás pretos dos Açores. Os outros grupos de chás não apresentam diferenças estatisticamente significativas em relação aos 6 grupos de chás considerados.

Um estudo (Lin *et al.*, 2012) refere que quando um chá tem um deficiente teor em fósforo, na sua infusão em água diminui a concentração de polifenóis totais, o total de aminoácidos livres e os flavonóides, mas a relação entre o total de polifenóis e o total de aminoácidos livres e de açúcares solúveis em água aumenta. Este facto faz com que o chá assim obtido seja mais amargo e mais adstringente, ou seja, as qualidades sensoriais e bioquímicas do chá verde são reduzidos pela deficiência de fósforo.

2.3.2.5 - Teor de azoto

O teor de azoto apresentou uma grande variância entre as folhas de chá, no entanto o que apresentou uma maior quantidade de azoto foi o chá preto dos Açores “Gorreana Pekoe” (PA2), seguido de outro chá preto açoriano o “Gorreana Orange Pekoe” (PA1).

O chá que apresenta o menor teor de azoto é o chá preto comercial com canela e laranja (PC6) (Figura 2.8).

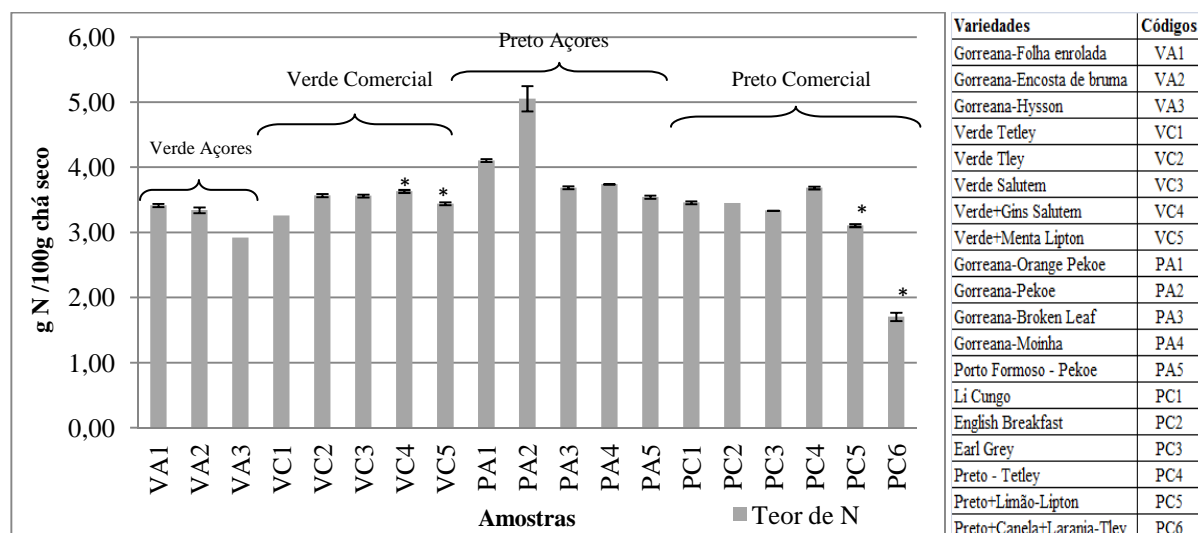


Figura 2. 8 - Teor de azoto das amostras de chá analisadas; * adicionados

A média do teor de azoto nos chás analisados foi de $3,47 \pm 0,61$, no entanto a variância deste teor nos chás analisados foi de 17,65% (Tabela 2.12). Verificou-se que os chás verdes dos Açores apresentaram um teor médio mais baixo que os restantes chás verdes, e os chás pretos dos Açores apresentaram um valor mais elevado que os chás comerciais.

Tabela 2. 12 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de azoto dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Azoto (g/100g chá seco) | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 3,23 ^{ab} | 3,46 ^{ab} | 3,54 ^{ab} | 4,03 ^b | 3,49 ^{ab} | 2,41 ^a | 3,47 |
| Desvio Padrão | 0,27 | 0,18 | 0,13 | 0,61 | 0,15 | 1,00 | 0,61 |
| Coeficiente de Variação (%) | 8,32 | 5,09 | 3,80 | 15,14 | 4,22 | 41,46 | 17,65 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Este factor é bastante homogéneo destacando-se com teores de azoto significativamente diferentes os grupo dos chás pretos adicionados, sendo este significativamente inferior e o chá preto dos Açores significativamente superior. Os chás pretos adicionados (com canela e laranja e com limão) apresentaram um teor de azoto inferior a todas as outras categorias devido à presença de extractos de citrinos na sua composição. Os chás pretos dos Açores apresentaram um valor médio superior aos outros chás, destacando-se os contributos dos chás “Gorreana Pekoe” e “Orange Pekoe” com valores significativamente superiores a todos os outros chás ($p < 0,05$).

Os valores de azoto obtidos neste estudo estão dentro dos teores de azoto encontrados na literatura. Existem alguns estudos (Wang *et al.*, 2006) que após a análise de 28 amostra de chás verdes chegaram a um teor médio de azoto total de $3,99 \pm 0,53\%$. No entanto outros estudos (Mohammed *et al.*, 2009), que analisaram chás de várias proveniências, nomeadamente, da China, do Quénia, da India, do Sri

Lanka e de Mambila (zona na Nigéria), apresentam um valor médio que fica abaixo do valor do estudo anterior ($1,43 \pm 0,376$ g de azoto por 100 g de chá seco).

Este teor é por vezes apresentado como teor de proteína o qual se relaciona com o teor de azoto pelo factor 6,25 o qual é a 0,16 g de azoto por grama de proteína. É necessária a utilização deste factor uma vez que o método Kjeldahl não determina directamente o teor de proteína mas sim o teor de azoto total.

Assim, num estudo (Rehman *et al.*, 2002) apresentou valores de % de proteína bruta para três variedades de chá “Lipton” de $3,94 \pm 0,011$, $4,08 \pm 0,005$ e de $4,09 \pm 0,051$. No entanto, noutro estudo (Imran *et al.*, 2011) os valores de proteína para os vários chás apresentados variaram entre $1,82 \pm 0,02$ e $3,13 \pm 0,01\%$.

Os valores dos teores de proteína apresentados por estes últimos autores são da ordem de grandeza dos teores de azoto obtidos neste estudo e dos teores de outros autores. Sendo estes valores referentes ao valor de proteína, os teores de azoto obtidos nestes dois últimos estudos serão 6,25 vezes menores do que os resultados apresentados.

Noutros estudos o valor de proteína apresentou teores para os chás pretos aproximados aos que dariam neste estudo, uma vez que apresentaram teores de $15,12 \pm 0,51\%$ (Imran *et al.*, 2013) e teores que variaram entre $21,22 \pm 0,04$ e $22,81 \pm 0,00\%$ (Serpen *et al.*, 2012).

No caso dos teores de azoto (Tabela 2.12) acontece exactamente o mesmo que para os teores de fósforo, ou seja, encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo de chás pretos comerciais aditivados e os chás pretos dos Açores. Os outros grupos de chás não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos 6 grupos de chás considerados.

2.3.2.6 - Composição mineral das folhas (Mg, Al, Ca, Na, K)

A análise de minerais nas folhas foi feita com uma finalidade nutricional mas também para garantia segurança alimentar.

As folhas de chá verde e preto foram estudadas no sentido de determinar o seu conteúdo mineral a nível de macroelementos. Determinou-se, por absorção atómica por determinação à chama, o teor dos metais Na, Mg, Al, K e Ca, os quais foram expressos mg / Kg de chá seco.

Os limites de detecção e de quantificação para os vários metais foram os seguintes:

| | Na | Mg | Al | K | Ca |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Limite de detecção (mg/L) | 0,0855 | 0,0377 | 0,4792 | 0,1882 | 0,3277 |
| Limite de quantificação (mg/L) | 0,2924 | 0,1279 | 1,6398 | 0,6374 | 1,1310 |

2.3.2.6.1 – Teor de Sódio

A principal função do sódio é a manutenção da pressão osmótica do meio extracelular evitando uma perda excessiva de água. Também é importante para a transmissão electroquímica nos músculos e permeabilidade celular (Almeida & Afonso, 1997).

Em relação aos valores obtidos para o teor de sódio nas folhas de chá apresentam-se na figura abaixo. Verifica-se que o chá que apresentou um maior teor foi o chá verde com menta (VC5) com $6504,2 \pm 15,2$ mg de Na/Kg de chá seco, valor significativamente superior a todos os outros chás estudados. Este facto pode ser explicado elevado teor de sódio existente na hortelã-pimenta, superior ao do chá verde cerca de 30 a 35 vezes (Kara *et al.*, 2009).

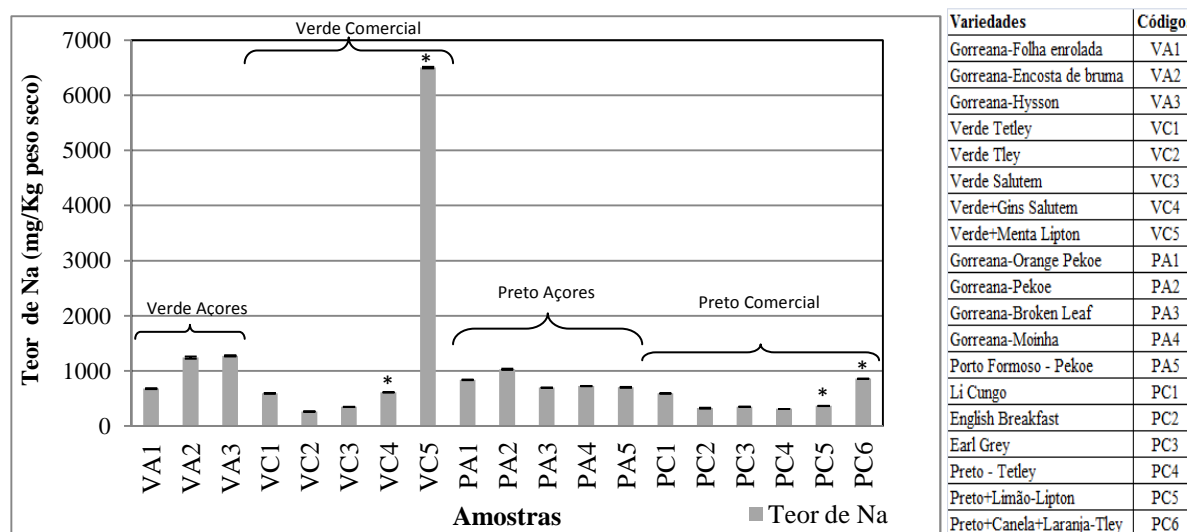


Figura 2. 9 - Teor de sódio das amostras de chá analisadas; * adicionados

O chá que menor valor apresentou é o chá verde comercial (VC2) com um valor de $265,6 \pm 5,0$ mg de Na/Kg de chá seco (Figura 2.15).

Num estudo realizado por Ferrara e colaboradores (Ferrara *et al.*, 2001) os teores de sódio obtidos após incineração e digestão de 3,0 g de folhas de chá foram de 8219 mg/Kg chá seco para o chá “Twinning English Tea” e de 14579 mg/Kg chá seco para o chá “Twinning Earl Grey”. Para estes tipos de chá existem outros estudos com teores diferentes, nomeadamente para o “Earl Grey com valores de 135 ± 2 mg de Na/Kg chá seco (Kumar *et al.*, 2005) e para o “English Breakfast” com valores de 158 ± 12 mg de Na/Kg chá seco (Dambiec *et al.*, 2013).

Tabela 2. 13 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de sódio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Sódio (mg/Kg chá seco) | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 1065,48 ^a | 402,73 ^a | 3558,25 ^a | 798,76 ^a | 394,96 ^a | 612,58 ^a | 964,21 |
| Desvio Padrão | 335,17 | 170,93 | 4166,22 | 141,15 | 132,58 | 349,36 | 1374,57 |
| Coeficiente de Variação (%) | 31,46 | 42,44 | 117,09 | 17,67 | 33,57 | 57,03 | 142,56 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

O grupo de chá que apresentaram maior teor de sódio foi o correspondente ao dos chás verdes comerciais com $3558,25 \pm 4166,22$ mg de Na/Kg de chá seco (Tabela 2.13). No entanto, a comparação das médias dos teores de sódio entre os 6 grupos de chás considerados não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os teores de sódio no chá são variados, dependendo do tipo de chá e da sua origem e mesmo do próprio estudo. Assim, para o chá verde encontram-se teores para o chá verde de 1800 mg/Kg chá seco (chinês) (Ferrara *et al.*, 2001), de 338 ± 286 mg/Kg chá seco (Kumar *et al.*, 2005), de $28,51 \pm 5,10$ mg/Kg chá seco (Ozcan *et al.*, 2008), de 132 ± 45 mg de Na/Kg de chá seco (Olivier *et al.*, 2012), de $52,6 \pm 1,8$ mg/Kg chá seco (Kara *et al.*, 2009), de $3,56 \pm 1,06$ mg/Kg chá seco (chinês) (Gallaher *et al.*, 2006) e de $3,92 \pm 1,02$ mg/Kg chá seco (autêntico) (Gallaher *et al.*, 2006). Para o chá preto da Síria 32142 mg/Kg chá seco (Ferrara *et al.*, 2001), de $53,5 \pm 27,5$ mg/Kg chá seco (Kumar *et al.*, 2005), de 210 ± 77 mg de Na/Kg de chá seco (Olivier *et al.*, 2012), de $139 \pm 2,7$ mg/Kg chá seco (Kara *et al.*, 2009) e de $46,96 \pm 18,73$ mg/Kg chá seco (Ozcan *et al.*, 2008).

Noutro estudo (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) para os chás verdes os teores variam entre 3,56 e $1,10 \cdot 10^4$ mg de Na/Kg de chá seco e para os chás pretos os teores de sódio variam entre 11,0 e $3,20 \cdot 10^4$ mg de Na/Kg de chá seco.

2.3.2.6.2 – Teor de Magnésio

O magnésio encontra-se na estrutura óssea e faz parte das enzimas desenvolvendo funções reguladoras, mantendo o potencial eléctrico de membranas nervosas e musculares e ainda promovendo a síntese proteica. Uma das funções mais importantes é ser um cofactor da síntese e utilização do ATP (Almeida & Afonso, 1997).

No que respeita aos valores obtidos para o teor de magnésio, as folhas de chá que apresentaram maior teor foram as dos chás verdes dos Açores sendo que a que apresenta maior teor é a “Folha Enrolada, Gorreana” (VA1) com um valor de $3802,4 \pm 2,0$ mg de Mg/Kg de chá seco. O menor valor foi apresentado pelo chá verde comercial (VC1) com $1595,1 \pm 7,7$ mg de Mg/Kg de chá seco (Figura 2.10).

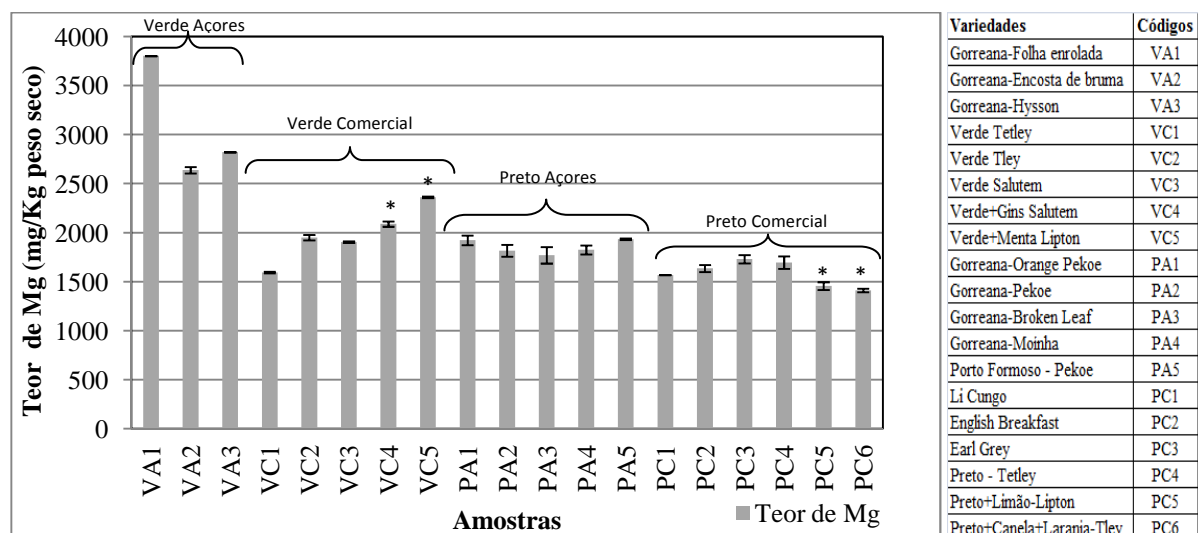


Figura 2. 10 - Teor de magnésio das amostras de chá analisadas; * adicionados

Os chás verdes dos Açores têm teores de magnésio significativamente superiores aos chás pretos, bem como aos chás verdes comerciais adicionados.

Neste estudo, o teor de magnésio determinado para os chás pretos comerciais “Earl Grey” e “English Breakfast” foi, respectivamente, de $1729,8 \pm 42,3$ mg de Mg/Kg de chá seco e de $1636,5 \pm 35,5$ mg de Mg/Kg de chá seco.

Tabela 2. 14 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de magnésio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Magnésio (mg/Kg chá seco) | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 3087,58 ^c | 1817,26 ^{ab} | 2225,78 ^b | 1854,05 ^{ab} | 1657,95 ^{ab} | 1434,80 ^a | 1996,72 |
| Desvio Padrão | 625,87 | 193,78 | 192,78 | 71,35 | 70,54 | 31,62 | 572,31 |
| Coeficiente de Variação (%) | 20,27 | 10,66 | 8,66 | 3,85 | 4,25 | 2,20 | 28,66 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Verificou-se que, de entre dos chás pretos, os que apresentaram maior teor de magnésio foram também os chás dos Açores com uma média de $1854,1 \pm 71,35$ mg de Mg/Kg de chá seco (Tabela 2.14).

Comparando os grupos analisados verificou-se que os chás verdes dos Açores apresentaram teores significativamente superiores a todos os outros grupos de chás. Este facto deve-se a que neste grupo dois dos chás (“Gorreana Hysson” e “Folha Enrolada”) terem valores significativamente superiores aos chás dos outros grupos. Dois grupos de chás foram significativamente diferentes entre eles, os chás verdes comerciais adicionados e os chás pretos comerciais adicionados, sendo que os chás verdes adicionados apresentaram teores superiores ($p < 0,05$) aos chás pretos comerciais adicionados.

A média apresentada neste estudo para os chás estudados foi de $1996,7 \pm 572,3$ mg de Mg/Kg de chá seco. Estes valores são semelhantes aos apresentados num estudo (McKenzie *et al.*, 2010) que para o teor de Mg obteve valores médios de 2181 mg /Kg de chá seco para os chás verdes analisados,

variando entre um valor mínimo de 1910 mg /Kg de chá seco e um valor máximo de 2665 mg /Kg de chá seco. Para os chás pretos o teor médio de Mg foi de 2308 mg /Kg de chá seco, o qual resulta da análise de teores de Mg nos chás que variaram entre um teor mínimo de 1984 mg /Kg de chá seco e um teor máximo de 2942 mg /Kg de chá seco. Os valores obtidos no estudo foram também semelhantes aos teores médios obtidos num estudo realizado por Malik e seus colaboradores (Malik *et al.*, 2008) cujos teores variam de 2128 ± 52 a 2482 ± 99 mg de Mg/Kg de chá seco para o chá verde e de 2485 ± 100 a 2648 ± 34 mg de Mg/Kg de chá seco para o chá preto. Noutro estudo realizado por Olivier e colaboradores (Olivier *et al.*, 2012) os teores apresentados foram de 1956 ± 214 mg de Mg/Kg de chá seco para o chá verde (oriental) e de 1888 ± 82 mg de Mg/Kg de chá seco para o chá preto de Ceilão.

No estudo de Ozcan e colaboradores (Ozcan *et al.*, 2008) os valores determinados para o teor de magnésio foram de $58,4 \pm 31,17$ mg de Mg/Kg de chá seco para o chá verde e de $156,3 \pm 68,50$ mg de Mg/Kg de chá seco para o chá preto.

No estudo efectuado por Szymczycha-Madeja e colaboradores (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) os chás verdes e pretos apresentaram os seguintes valores: para o chá verde o teor variou de 140 e 31000 mg de Mg/Kg de chá seco; para o chá preto o teor variou entre 90 e 34000 mg de Mg/Kg de chá seco.

A comparação das médias dos teores de magnésio entre os 6 grupos de chás considerados (Tabela 2.14) revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o chá verde dos Açores e todos os outros grupos de chá. Verificou-se ainda que chá verde comercial aditivado apresentou diferenças estatisticamente significativas dos chás pretos comerciais aditivados. No entanto, estes dois últimos grupos de chá não revelaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos chás comerciais (pretos e verdes) e aos chás pretos dos Açores.

2.3.2.6.3 – Teor de Alumínio

Em relação aos valores obtidos para o teor de alumínio, as folhas de chá que apresentaram um maior teor foram as dos chás verdes comerciais adicionados, sendo o chá verde com ginseng (VC4) aquele que apresentou o maior valor ($3730,51 \pm 40,74$ mg de Al/Kg de chá seco). O chá que apresentou menor valor foi o chá “Orange Pekoe” da “Gorreana” (VA1) com um valor de $537,44 \pm 5,55$ mg de Al/Kg de chá seco (Figura 2.11).

Os chás verdes comerciais adicionados, quer com menta (VC4) quer com ginseng (VC5), bem como o chá verde tetley (VC1) apresentaram teores de alumínio significativamente superiores a todos os outros chás analisados neste estudo.

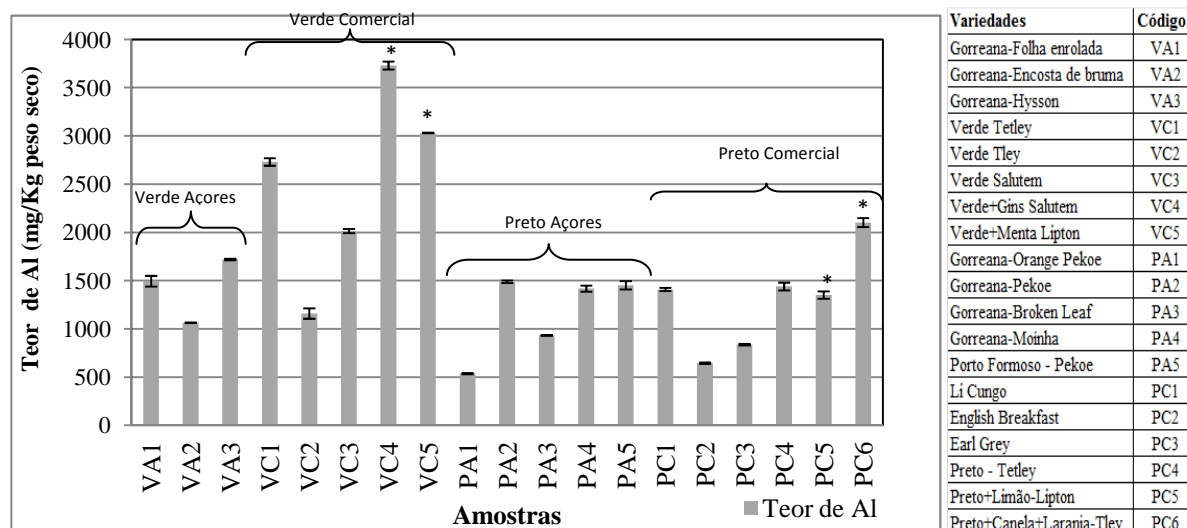


Figura 2. 11 - Teor de alumínio das amostras de chá analisadas; * adicionados

Um estudo (Marcos *et al.*, 1998) determinou o teor de Al para os chás pretos “Earl Grey” e “English Breakfast” de $868 \pm 1,7$ e de $885 \pm 0,3$ mg de Al/Kg de chá seco. Estes valores são semelhantes aos obtidos neste estudo para o primeiro chá nomeado mas superiores ao segundo. Os valores obtidos foram de $836,0 \pm 8,3$ e de $645,9 \pm 7,9$ mg de Al/Kg de chá seco, respectivamente.

Tabela 2. 15 - Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de alumínio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Alumínio (mg/Kg chá seco) | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 1425,60 ^a | 1967,92 ^a | 3381,21 ^a | 1165,96 ^a | 1082,38 ^a | 1726,84 ^a | 1608,21 |
| Desvio Padrão | 333,20 | 786,57 | 493,98 | 417,87 | 402,03 | 530,89 | 818,40 |
| Coeficiente de Variação (%) | 23,37 | 39,97 | 14,61 | 35,84 | 37,14 | 30,74 | 50,89 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

O grupo de chás verdes que apresentou menor teor de alumínio foi o correspondente aos chás dos Açores ($1425,60 \pm 333,20$ mg de Al/Kg de chá seco). No que respeita aos chás pretos o grupo que apresentou menor valor foi o de chás comerciais ($1082,38 \pm 402,03$ mg de Al/Kg de chá seco) logo seguido dos chás dos Açores com um valor médio ligeiramente superior ($1165,96 \pm 417,87$ mg de Al/Kg de chá seco) (Tabela 2.15).

Foram determinados teores médios para alumínio de 1362 ± 555 mg de Al/Kg de chá seco para os chás verdes (oriente) e de 901 ± 144 mg de Al/Kg de chá seco para os chás pretos de Ceilão (Olivier *et al.*, 2012).

Noutro estudo realizado por Ansari e seus colaboradores (Ansari *et al.*, 2007) sobre o chá preto, os teores de Al por eles obtidos foram os seguintes: para o chá preto iraniano o valor mínimo observado de 405,0 mg de Al/Kg de chá seco e o máximo de 1013,0 mg de Al/Kg de chá seco a que correspondeu um valor médio de $699,2 \pm 172,8$ mg de Al/Kg de chá seco; para o chá preto importado o valor mínimo observado foi de 266,7 mg de Al/Kg de chá seco e o máximo de 622,0 mg de Al/Kg de chá seco a que correspondeu um valor médio de $388,3 \pm 98,3$ mg de Al/Kg de chá seco.

Malik e colaboradores (Malik *et al.*, 2008) apresentaram valores de Al de 211 ± 7 , de 353 ± 38 e de 240 ± 37 mg /Kg de chá seco para os chás verdes “Assam”, “Gunpowder” e “Mondakotee”, respectivamente, e de 288 ± 32 e de 161 ± 9 mg /Kg de chá seco para os chás pretos “Assam OP” e “Darjeeling”, respectivamente.

Szymczycha-Madeja e colaboradores (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) apresentaram para os chás verdes um teor que varia de $0,02 \cdot 10^3$ a $13,0 \cdot 10^3$ mg de Mg/Kg de chá seco para os chás verdes e para os chás pretos um teor que varia entre $0,05 \cdot 10^3$ e $27,0 \cdot 10^3$ mg de Mg/Kg de chá seco. Ozcan e colaboradores (Ozcan *et al.*, 2008) apresentaram um teor de $22,9 \pm 7,9$ e $106,5 \pm 42,94$ mg de Al/Kg de chá seco respectivamente para o verde e para o chá preto.

A comparação das médias dos teores de alumínio entre os 6 grupos de chás considerados (Tabela 2.15) revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o grupo dos chás verdes adicionados e todos os outros grupos de chá.

2.3.2.6.4 – Teor de Potássio

O potássio, principal catião do meio intracelular, tem um papel importante na maior parte das funções vitais: metabolismo celular, regulação do conteúdo de água, activação dos sistemas enzimáticos na síntese proteica e excitabilidade neuromuscular (Almeida & Afonso, 1997).

No que respeita aos valores obtidos para o teor de potássio (Figura 2.12), as folhas de chá que apresentaram maior teor foram as do chá verde comercial adicionado com ginseng (VC4) com um valor de $20624,4 \pm 267,8$ mg de K/Kg de chá seco, teor que foi significativamente superior a todos os outros chás. O menor valor foi apresentado pelo chá preto comercial adicionado com canela e laranja (PC6) com $5411,1 \pm 14,7$ mg de K/Kg de chá seco, significativamente inferior a todos os outros.

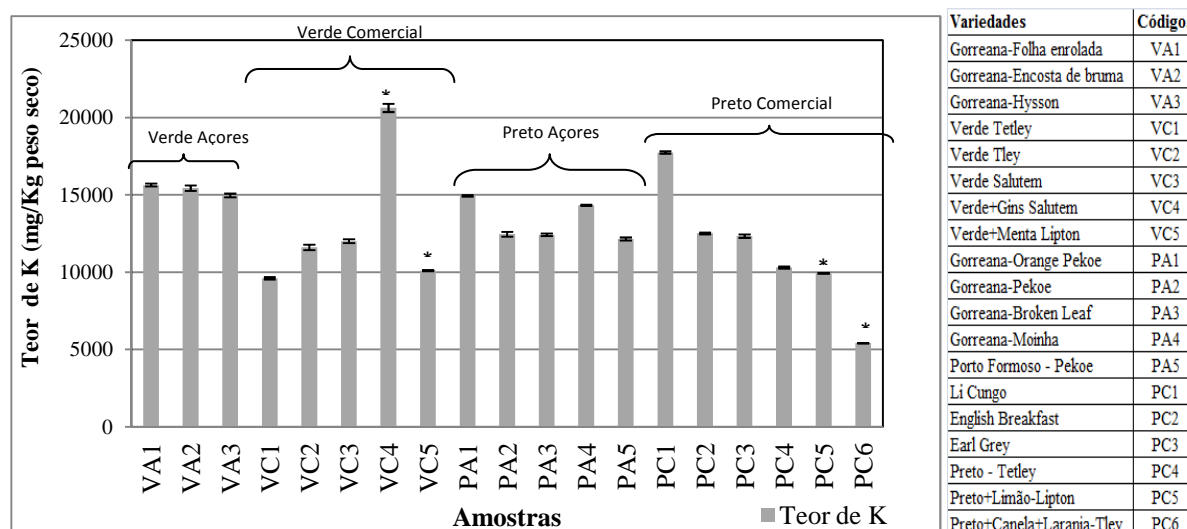


Figura 2. 12 - Teor de potássio das amostras de chá analisadas; * adicionados

Para o chá “Earl Grey” foram determinados valores de teor de potássio de 188697 mg de K/Kg chá seco para a marca “Twinning” (Ferrara *et al.*, 2001) e de 19500 ± 1000 mg/Kg chá seco (Kumar *et al.*, 2005). Para o chá “English Breakfast” foram determinados teores de 261301 mg de K/Kg chá seco, para a marca “Twinning” (Ferrara *et al.*, 2001) e de 17400 mg/Kg chá seco, para a marca “Ahmad” (Dambiec *et al.*, 2013).

Tabela 2. 16 - Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de potássio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Potássio (mg/Kg chá seco) | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |

| Teor de Potássio (mg/Kg chá seco) | | | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------|
| Média | 15342,20 ^a | 11072,56 ^a | 15363,41 ^a | 13253,62 ^a | 13219,62 ^a | 7670,18 ^a | 12866,21 |
| Desvio Padrão | 347,14 | 1285,33 | 7440,19 | 1276,61 | 3171,65 | 3194,86 | 3346,38 |
| Coeficiente de Variação (%) | 2,26 | 11,61 | 48,43 | 9,63 | 23,99 | 41,65 | 26,01 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

O valor médio de teor de potássio das amostras incluídas neste estudo foi de $12866,21 \pm 3346,38$ mg de K/Kg chá seco (Tabela 2.16).

A comparação das médias dos teores de sódio entre os 6 grupos de chás considerados (Tabela 2.16) não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). No entanto os grupos de chás comerciais adicionados apresentaram coeficientes de variância elevados (os chás verdes com 48,4% e os chás pretos com 41,7%). Verificou-se que dentro de cada um destes dois grupos os valores foram significativamente diferentes.

No caso dos chás pretos comerciais verificou-se que existe um chá (preto comercial “Li-Cungo”) que tem um teor significativamente superior aos outros chás analisados com a exceção do chá verde com ginseng.

Gallaher e colaboradores (Gallaher *et al.*, 2006) apresentaram teores de potássio de $27,66 \pm 0,90$ mg de K/Kg chá seco para o chá para o chá verde chinês e de $25,66 \pm 66$ mg de K/Kg chá seco para o chá verde autêntico. Noutro estudo os teores apresentados foram de 13327 mg/Kg chá seco para o chá verde e de 14313 mg/Kg chá seco para os chás pretos (Kara, 2009). Olivier e colaboradores (Olivier *et al.*, 2012) apresentaram teores de 13896 ± 1600 mg/Kg chá seco para o chá verde (oriental) e de 17267 ± 456 mg/Kg chá seco para o chá preto de Ceilão.

Noutro estudo (Malik *et al.*, 2008) foram apresentados teores de 18543 ± 939 mg/Kg chá seco, 17513 ± 1063 mg/Kg chá seco e 23086 mg/Kg chá seco para os chás verdes de “Assam”, “Gunpowder” e “Mondakoter”, respectivamente, e de 22751 ± 1169 mg/Kg chá seco e 23300 ± 1154 mg/Kg chá seco para os chás pretos “Assam OP” e “Darjeeling”, respectivamente.

Outro estudo (Kumar *et al.*, 2005) apresentou teores médios de 18100 ± 3500 mg de K/Kg chá seco para o chá verde e de 21100 ± 2000 mg de K/Kg chá seco para os chás pretos.

Para o chá verde chinês, Ferrara e colaboradores (Ferrara *et al.*, 2001) determinaram o teor de 262000 mg de K/Kg chá seco para o chá para chá verde chinês e de 286688 mg de K/Kg chá seco para o chá preto com origem na Síria. Szymczycha-Madeja e colaboradores (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) apresentaram valores de $0,63 \cdot 10^4$ a $2,99 \cdot 10^4$ mg de K/Kg chá seco para o chá verde e de $0,80 \cdot 10^4$ e $2,78 \cdot 10^4$ mg de K/Kg de chá seco.

Os valores obtidos neste estudo estão enquadrados, para todos os chás, nas gamas apresentadas por este último estudo.

2.3.2.6.5 – Teor de Cálcio

O cálcio é o quinto elemento mais abundante no organismo, perfazendo mais de 1 Kg, sendo que 99% dos quais estão nos ossos e nos dentes sob a forma de cristais de hidroxiapatite (Almeida & Afonso, 1997).

Quanto aos teores de cálcio obtidos nas folhas de chá, verificou-se que o chá que apresentou um maior teor foi o chá verde com menta (VC5) com $5445,8 \pm 52,8$ mg de Ca/Kg de chá seco.

O chá que menor valor apresentou foi o chá verde açoriano “Gorreana, Encosta da Bruma” (VA2) com um valor de $1407,0 \pm 24,9$ mg de Ca/Kg de chá seco (Figura 2.13).

Dos resultados obtidos verificou-se que os chás comerciais adicionados, verde com menta (VC5), preto com canela e laranja (PC6) e verde com ginseng (VC4), têm teores de cálcio significativamente superior aos chás pretos comerciais e aos chás dos Açores.

O chá verde comercial adicionado com menta (VC5) tem um teor significativamente superior a todos os outros chás analisados neste estudo. Este facto deve-se à menta ser bastante rica em cálcio (Kara *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2012).

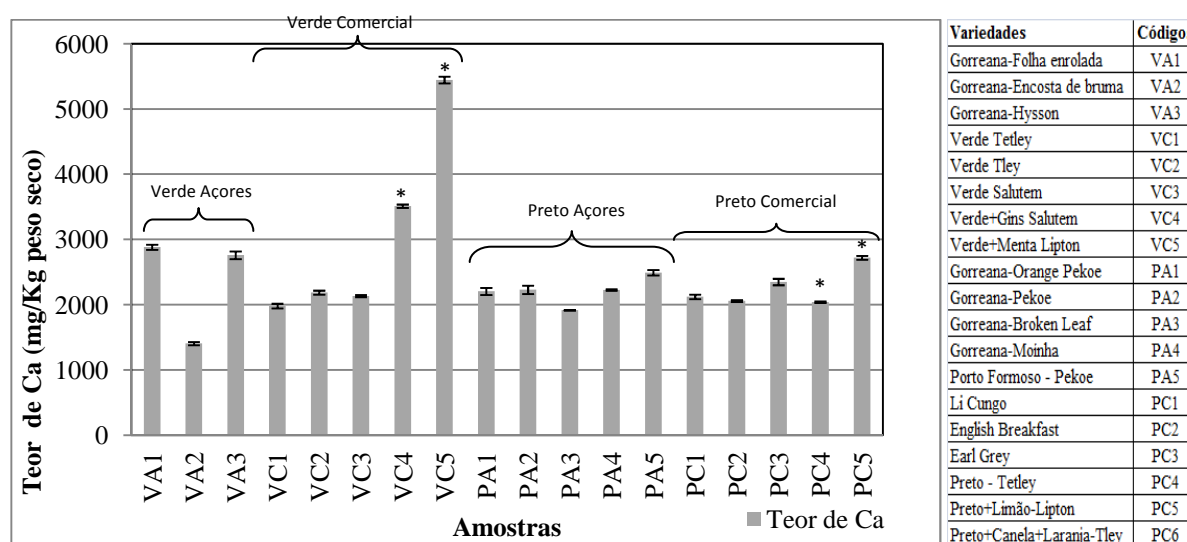


Figura 2. 13 - Teor de cálcio das amostras de chá analisadas; * adicionados

Foram determinados valores de $3288 \pm 0,4$ e de $4019 \pm 0,4$ mg de Ca/Kg de chá seco para os chás pretos “Earl Grey” e “English Breakfast” (Marcos *et al.*, 1998).

Para o chá preto “English Breakfast” da marca “Ahmad” foi determinado um teor médio de 2070 ± 88 mg de Ca/Kg de chá seco (Dambiec *et al.*, 2013), e para o chá preto “English Breakfast” da marca “Twinning” um teor médio de 41780 mg de Ca/Kg de chá seco (Ferrara *et al.*, 2001).

Para o chá preto “Earl Grey” da marca “Twinning” foi determinado um valor de cálcio de 29588 mg/Kg de chá seco (Ferrara *et al.*, 2001).

Tabela 2. 17 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cálcio dos diferentes tipos de chás agrupados de acordo com a sua origem geográfica, constituição e processo de produção.

| Teor de Cálcio (mg/Kg chá seco) | | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------|
| | Chá verde dos Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto dos Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 2349,62 ^a | 2100,34 ^a | 4478,52 ^b | 2213,69 ^a | 2142,90 ^a | 3306,92 ^{ab} | 2555,83 |

| Teor de Cálcio (mg/Kg chá seco) | | | | | | | |
|---------------------------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Desvio Padrão | 818,61 | 106,18 | 1367,96 | 204,43 | 142,61 | 829,57 | 903,37 |
| Coefficiente de Variação (%) | 34,84 | 5,06 | 30,54 | 9,23 | 6,66 | 25,09 | 35,35 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os grupos de chás que apresentaram maior teor de cálcio foram os chás comerciais adicionados, verdes e pretos que apresentaram valores médios de $4478,5 \pm 1368,0$ e de $3306,9 \pm 829,6$ mg de Ca/Kg de chá seco (Tabela 2.17).

Os chás verdes comerciais adicionados apresentaram teores estatisticamente superiores aos chás comerciais simples e chás do Açores. Tal facto deve-se a que o chá verde com menta (VC5) apresentou um teor significativamente superior a todos os outros chás analisados, o que poderá ser devido ao facto da hortelã-pimenta ter um teor de Ca cerca de 5/6 vezes superior ao teor de Ca do chá verde (Kara, 2009; Rubio *et al.*, 2012).

Os chás pretos adicionados apresentaram um teor intermédio de cálcio, não apresentando diferenças significativas com todos os grupos de chás analisados. No entanto, nesta categoria, o chá preto com canela e laranja apresentou um teor significativamente superior aos dos chás analisados, com excepção dos chás verdes adicionados.

Foi determinado um teor de cálcio para o chá verde de 5252 ± 937 mg de Ca/Kg de chá seco e de 4076 ± 199 mg de Ca/Kg de chá seco para o chá preto de Ceilão (Olivier *et al.*, 2012). Foram também apresentados teores médios de $3668 \pm 5,4$ mg de Ca/Kg de chá seco para o chá verde e de $3153 \pm 1,9$ mg de Ca/Kg de chá seco para os chás pretos (Kara *et al.*, 2009).

McKenzie e colaboradores (McKenzie *et al.*, 2010) apresentaram um teor médio de cálcio para o chá verde de 4863 mg/Kg de chá seco, com variação dos teores entre 3801 e 8710 mg /Kg de chá seco, e teores médios para o chá preto de 4848 mg/Kg de chá seco, com variação dos teores entre 2947 e 8050 mg /Kg de chá seco. Foram referidos valores nesta ordem de grandeza, teores de 6477 ± 576 , de 6274 ± 694 e de 4609 ± 74 mg de Ca/Kg de chá seco para os chás verdes “Assam”, “Gunpowder” e “Mondakotee”, respectivamente, e de 6678 ± 328 e de 4326 ± 190 mg de Ca/Kg de chá seco para os chás pretos “Assam OP” e “Darjeehing”, respectivamente (Kara *et al.*, 2009).

Foram também apresentados teores de 13750 mg de Ca/Kg de chá seco para o chá verde chinês e de 22451 mg de Ca/Kg de chá seco para chá preto oriundo da Síria (Ferrara *et al.*, 2001). Foi ainda referido que os chás verdes apresentavam um teor de cálcio que variava para os chás verdes de “não detectável” a $3,70 \times 10^4$ mg de Ca/Kg de chá seco e para os chás pretos um teor que variava entre não detectável a $4,70 \times 10^4$ mg de Ca/Kg de chá seco (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012).

2.3.3 - Caracterização das infusões (5 e 15 minutos) e Extracto Aquoso

As infusões de chá verde e preto de 5 e 15 minutos foram estudadas para determinação do peso seco e cinzas, expressos em % (mg/ml), e conteúdo de fenólicos totais, expresso como equivalentes de ácido gálico (mg/L de chá). Foi ainda estudado o extracto aquoso quanto ao peso seco, expresso em % (mg/ml), e aos fenólicos totais, expressos em mg/g peso seco folhas.

As infusões de 5 e 15 minutos preparadas a partir das folhas, anteriormente descritas, foram estudadas para determinação do conteúdo mineral, nomeadamente Na, Mg, Al, K, Ca, Cu e Zn, por absorção atómica por determinação à chama, expressos em mg/L de chá.

Considerando a média de cada um dos parâmetros analisados para todos os chás incluídos no estudo observou-se que a variação do tempo de infusão de 5 para 15 minutos resultou em diferenças significativas ($p < 0,05$) na componente mineral do chá, em particular os teores de cinzas e de componentes individuais como Na, Mg, Al, K, Ca, Cu e Zn.

2.3.3.1 - Peso seco

Infusões de 5 e 15 minutos

No que diz respeito às infusões de 5 minutos verificou-se que as infusões que apresentaram um menor peso seco foram aquelas que têm como origem o chá dos Açores (pretos e verdes) (Figura 2.14). O valor mais baixo observado diz respeito ao chá preto dos Açores Pekoe (PA2) com um teor de $157,10 \pm 0,00$ mg/100 mL de infusão. O teor mais elevado para a infusão de 5 minutos foi o referente ao chá verde comercial adicionado com ginseng (VC4) com $378,12 \pm 0,00$ mg/100 mL de infusão, significativamente superior a todos os outros.

Em relação às infusões de 15 minutos o chá que apresentou menor peso seco continuou a ser o chá preto dos Açores Pekoe (PA2) com um teor de $161,44 \pm 3,20$ mg/100 mL de infusão. O teor mais elevado para a infusão foi observado no chá verde comercial “Salutem” (VC3) com um teor de $443,88 \pm 7,47$ mg/100 mL de infusão, significativamente superior a todos os outros.

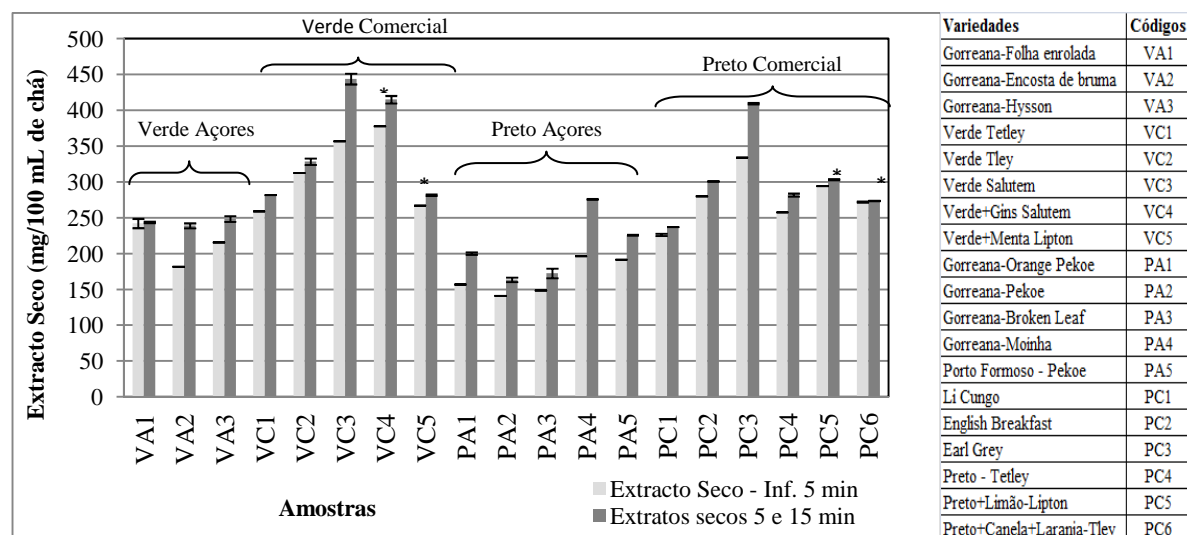


Figura 2. 14 – Peso seco das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Os chás comerciais verdes “Salutem”, simples (VC3) ou adicionado (VC4), verde “Tley” (VC2) e preto “Earl Grey” (PC3) têm teores de extracto significativamente superior a todos os outros, quer para as infusões de 5 minutos, quer para as infusões de 15 minutos.

Para cada tipo de chá, houve um aumento da extracção entre as infusões de 5 e 15 minutos e, consequentemente, um aumento do peso seco das infusões (Tabela 2.18), o teor médio do peso seco das infusões passou de 248,23±69,14 mg/100 mL de infusão para as infusões de 5 minutos para 280,42±76,55 mg/100 mL de infusão para as infusões de 15 minutos.

Pode ainda verificar-se que foram os chás dos Açores que apresentaram menor peso seco. De facto, os chás dos Açores foram aqueles que apresentaram teores significativamente mais baixos. Nas infusões de 5 minutos os chás pretos “Gorreana” de folha inteira (PA1, PA2 e PA3) apresentaram teores significativamente inferiores aos outros, seguidos do grupo de chás dos Açores (VA2, PA4 e PA5). Nas infusões de 15 minutos os chás pretos dos Açores de folha inteira (PA1, PA2, PA3 e PA5) foram os que apresentaram um teor significativamente inferior aos outros, o que pode ser devido ao facto de os chás de Açores se apresentarem quase todos em folha inteira enquanto os chás comerciais se apresentavam comercialmente com folhas moídas.

Tabela 2. 18 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos pesos secos dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| Peso Seco (mg/100 mL de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 213,29 ^{ab} | 309,79 ^b | 322,72 ^b | 167,21 ^a | 274,78 ^{ab} | 283,27 ^b | 248,23 |
| Desvio Padrão | 30,29 | 48,97 | 78,35 | 25,48 | 45,48 | 15,71 | 69,14 |
| Coeficiente de Variação (%) | 14,20 | 15,81 | 24,28 | 15,24 | 16,55 | 5,55 | 27,85 |
| Peso Seco (mg/100 mL de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 243,74 ^a | 351,44 ^a | 348,51 ^a | 207,64 ^a | 307,48 ^a | 288,61 ^a | 280,42 |
| Desvio Padrão | 4,77 | 83,35 | 94,17 | 45,32 | 73,11 | 21,00 | 76,55 |
| Coeficiente de Variação (%) | 1,96 | 23,72 | 27,02 | 21,83 | 23,78 | 7,28 | 27,30 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas (p<0.05) de acordo com o teste de Tukey.

Nas infusões de 5 minutos o chá preto dos Açores apresentou um teor de peso seco significativamente inferior a todos os chás comerciais, exceptuando-se o chá preto comercial simples, e aos chás verdes dos Açores. Esta diferença deixa de ser observada no caso das infusões de 15 minutos, o que indica que após 15 minutos a transferência de componentes das folhas para a água atingiu um valor de equilíbrio independentemente do tipo de chá.

Os chás verdes comerciais “Tley” e “Salutem”, o chá verde com ginseng e o chá preto “Earl Grey” apresentaram valores de extracto seco significativamente superiores aos outros chás quer nas infusões de 5 minutos, quer nas infusões de 15 minutos.

Extracto Aquoso

O extracto aquoso resulta de uma extracção exhaustiva das folhas ao ponto de ebulição da água pelo que é natural que as diferenças devidas à natureza dos chás e à sua granulometria se esbatam. De facto, tal como nas infusões de 15 minutos, não se observaram diferenças significativas entre as médias dos diferentes tipos de chá. O valor mais baixo obtido foi referente ao peso seco do chá preto dos Açores (“Porto Formoso – Pekoe”, PA5) com um teor de $105,30 \pm 2,40$ mg/ 100 mL de extracto (Figura 2.15). O maior teor observado refere-se ao chá comercial preto “Earl Grey” com um valor de $168,90 \pm 5,52$ mg/ 100 mL de extracto significativamente superior aos outros.

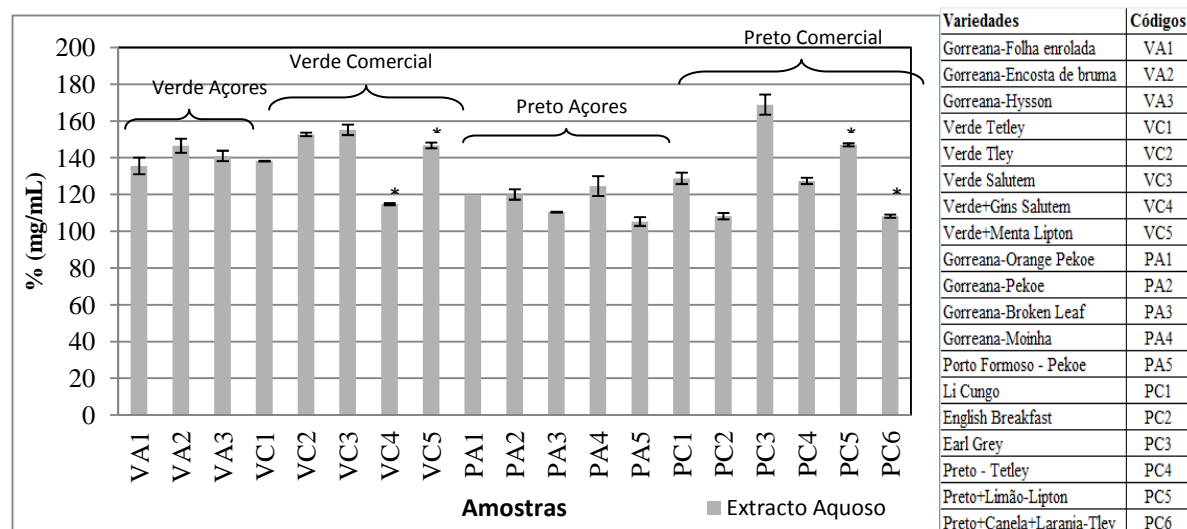


Figura 2. 15 – Extracto aquoso das amostras de analisadas; * adicionados

De facto (Tabela 2.19), verificou-se que o valor médio para este teor do total dos chás foi de $231,54 \pm 18,40$ mg/ 100 mL de extracto, além de um menor coeficiente de variância que foi de 13,99% enquanto nas infusões era de 27,85% e de 27,30% para as infusões de 5 e de 15 minutos, respectivamente.

Esta maior homogeneidade de resultados poderá ser devida ao maior tempo de extracção que atenua o efeito da moagem das folhas.

Tabela 2. 19 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos extractos aquosos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| Extracto Aquoso (mg/100 mL de chá) | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 141,03 ^a | 148,67 ^a | 130,75 ^a | 116,02 ^a | 133,33 ^a | 127,60 ^a | 131,54 |
| Desvio Padrão | 5,45 | 9,24 | 22,56 | 7,91 | 25,51 | 27,44 | 18,40 |
| Coeficiente de Variação (%) | 3,86 | 6,21 | 17,25 | 6,82 | 19,13 | 21,50 | 13,99 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

A comparação das médias de pesos secos entre os 6 grupos considerados (Tabela 2.19) não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

No entanto, houve grupo onde existiram chás significativamente diferentes, nomeadamente nos grupos de chás comerciais adicionados (verdes e pretos) e nos chás pretos comerciais.

2.3.3.2 - Teor de Cinzas

Infusões de 5 e 15 minutos

No que diz respeito às infusões de 5 minutos verificou-se que as infusões que apresentaram um menor teor de cinzas foram, maioritariamente, aquelas que têm como origem o chá dos Açores (Figura 2.16). O valor mais baixo observado, significativamente mais baixo, diz respeito ao chá preto dos Açores (PA2) com um teor de $22,42 \pm 0,93$ mg/100 mL de infusão. O teor mais elevado para a infusão de 5 minutos foi o referente ao chá preto comercial (PC3) com $66,56 \pm 0,11$ mg/100 mL de infusão, o qual juntamente com o chá verde comercial adicionado com ginseng (VC4), com $65,78 \pm 0,65$ mg/100 mL de infusão, têm um teor de cinzas significativamente superior aos outros chás analisados.

Em relação às infusões de 15 minutos o chá que apresentou um teor de cinzas significativamente inferior foi o verde comercial (VC1) com teor de $50,10 \pm 1,41$ mg/100 mL de infusão. O teor mais elevado para a infusão de 15 minutos foi o do chá verde comercial adicionado com ginseng (VC4) com um teor de $178,00 \pm 0,28$ mg/100 mL de infusão, significativamente superior aos dos chás analisados.

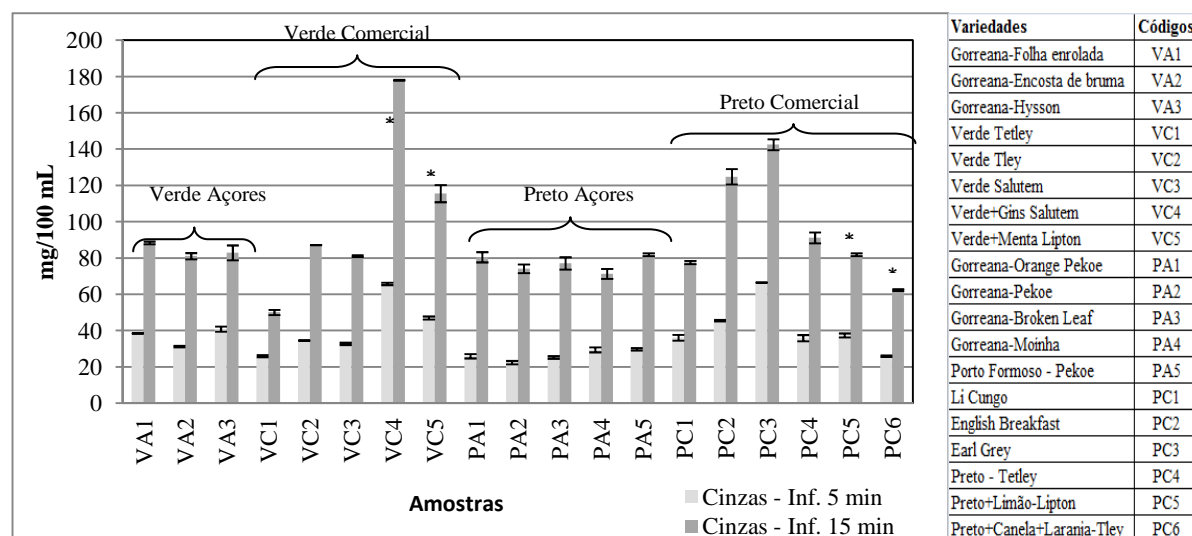


Figura 2. 16 – Teor de cinza das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

O teor de cinzas médio obtido para as infusões de 5 minutos foi inferior ao mesmo teor para as infusões de 15 minutos, sendo os valores de $36,71 \pm 12,40$ mg/100 mL de infusão e de $91,03 \pm 29,87$ mg/100 mL de infusão, respectivamente.

Em relação aos chás verdes, as infusões que apresentaram menor teor de cinzas foram as de chá comercial, quer para os 5 quer para os 15 minutos, enquanto no que diz respeito aos chás pretos foram as de chá dos Açores que apresentaram menor teor para as infusões de 5 minutos e os comerciais adicionados para as infusões de 15 minutos (tabela 2.20).

Tabela 2. 20 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinza dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| Teor de cinzas (mg/100 mL de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 36,88 ^{ab} | 31,16 ^a | 56,39 ^b | 26,61 ^a | 46,04 ^{ab} | 31,72 ^a | 36,71 |
| Desvio Padrão | 5,00 | 4,51 | 13,28 | 3,10 | 14,40 | 8,09 | 12,40 |
| Coeficiente de Variação (%) | 13,56 | 14,47 | 23,55 | 11,65 | 31,28 | 25,50 | 33,78 |
| Teor de cinzas (mg/100 mL de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 84,12 ^a | 72,80 ^a | 146,78 ^b | 76,99 ^a | 109,01 ^{ab} | 72,18 ^a | 91,03 |
| Desvio Padrão | 3,78 | 19,90 | 44,16 | 4,38 | 29,87 | 13,75 | 29,87 |
| Coeficiente de Variação (%) | 4,49 | 27,34 | 30,09 | 5,69 | 27,40 | 19,06 | 32,81 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

A comparação das médias dos teores de cinza entre os 6 grupos de infusões considerados (Tabela 2.20) revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Nas infusões de 5 minutos o chá verde comercial adicionado apresentou valores significativamente superiores em relação aos outros grupos de chá, exceptuando-se os chás pretos simples e o chá verde dos Açores. Nas infusões de 15 minutos o chá verde comercial adicionado só não apresentou diferenças significativas em relação aos chás pretos comerciais simples.

Os chás verdes comerciais adicionados, o verde “Salutem” e o preto “Earl Grey” apresentaram valores de cinza significativamente superiores aos outros chás quer nas infusões de 5 minutos, quer nas infusões de 15 minutos.

2.3.3.3 – Teor de Fenólicos totais

Infusões de 5 e 15 minutos

Pela análise dos resultados obtidos (Figura 2.17) pode verificar-se que, nas infusões de 5 minutos, a maior quantidade de fenólicos totais extraída das folhas de chá foi observada no chá verde comercial (VC1) com um teor de $817,81 \pm 1,74$ mg/L de infusão, enquanto a menor quantidade foi no chá preto “Gorreana Broken Leaf” (PA3) com um teor $129,02 \pm 3,00$ mg/L de infusão. Estes teores foram significativamente superior e inferior aos chás analisados, respectivamente.

Nas infusões de 15 minutos, a maior quantidade de fenólicos totais extraída das folhas de chá, significativamente superior aos outros chás, foi verificada no chá verde comercial com menta (VC5) com o teor de $942,48 \pm 3,76$ mg/L de infusão, enquanto a menor quantidade foi no chá preto “Gorreana Broken Leaf” (PA3) com um teor de $152,47 \pm 2,89$ mg/L de infusão. Os chás pretos dos Açores apresentaram teores de fenólicos totais significativamente inferiores aos outros.

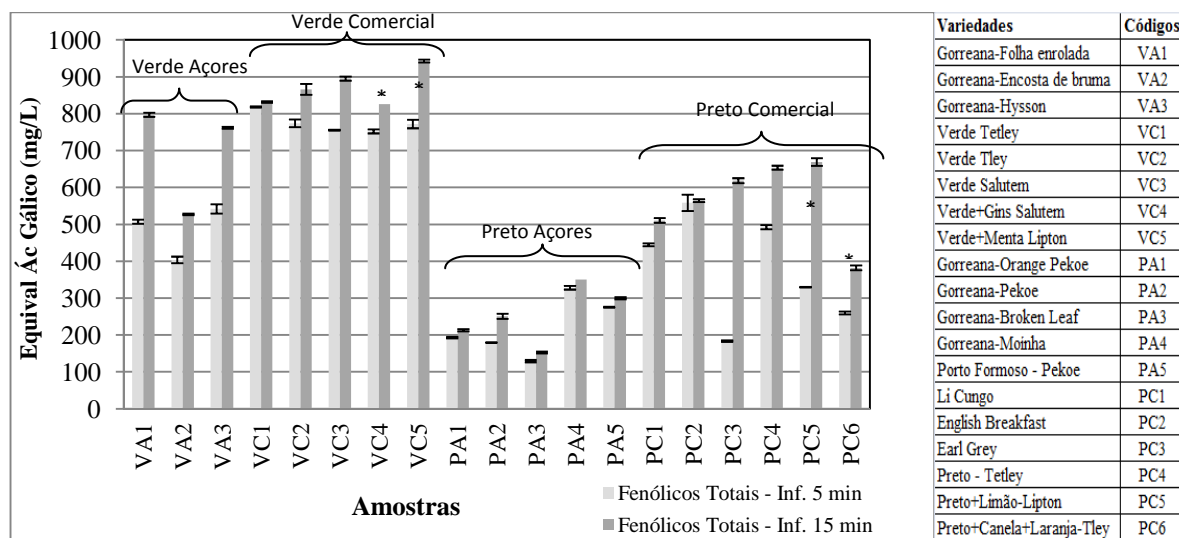


Figura 2. 17 – Teor de fenólicos totais das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

A variação de teores de fenólicos totais para os chás verdes, observada neste estudo para infusões de 5 minutos, foi também mencionada num estudo realizado por Komes e colaboradores (2010). Esta diferença é justificada pela forma como são disponibilizados os chás: em folhas, como é o caso dos chás verdes dos Açores, e em pó ou granulado, como é o caso dos chás verdes comerciais. Aqui tal como nesse estudo (Komes *et al.*, 2010) os chás em pó ou granulados apresentaram maiores teores de fenólicos que os que se apresentaram em folhas.

Verificou-se que os chás pretos apresentaram um menor teor de fenólicos totais do que os correspondentes chás verdes (Tabela 2.21). Dentre os chás analisados, os chás verdes dos Açores apresentaram uma média dos teores de compostos fenólicos inferior aos restantes chás verdes (comerciais) apresentando os teores de $484,18 \pm 71,91$ mg/L de infusão e de $695,15 \pm 146,70$ mg/L de infusão para as infusões de 5 e de 15 minutos, respectivamente.

Tabela 2. 21 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| Teor de fenólicos totais (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 484,18 ^a | 782,32 ^b | 761,97 ^b | 220,77 ^a | 419,70 ^a | 294,46 ^a | 457,63 |
| Desvio Padrão | 71,91 | 32,05 | 14,18 | 79,58 | 164,17 | 49,60 | 231,47 |
| Coeficiente de Variação (%) | 14,85 | 4,10 | 1,86 | 36,05 | 39,12 | 16,84 | 50,58 |
| Teor de fenólicos totais (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 695,15 ^{bc} | 864,17 ^c | 884,21 ^c | 253,19 ^a | 586,67 ^b | 525,30 ^{ab} | 584,72 |
| Desvio Padrão | 146,70 | 31,76 | 82,41 | 76,54 | 62,68 | 202,95 | 251,13 |
| Coeficiente de Variação (%) | 21,10 | 3,68 | 9,32 | 30,23 | 10,68 | 38,64 | 42,95 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

O mesmo se verificou para os chás pretos dos Açores, que apresentaram o teor de fenólicos totais mais baixos que os restantes chás pretos. O teor mais alto de fenólicos totais para cada tipo de chá, extraídos nas infusões de 5 e de 15 minutos foi apresentado pelos chás comerciais preto e verde, com valores, para a infusão de 5 minutos, de $419,70 \pm 164,17$ mg/L infusão e $782,32 \pm 32,05$ mg/L infusão, e para as infusões de 15 minutos $586,67 \pm 62,68$ de mg/L infusão e $864,17 \pm 31,76$ mg/L infusão, respectivamente.

Utilizando vários tipos de água na preparação de chá verde, para infusões de 15 minutos, os teores de polifenóis no chá que variaram entre $34,8 \pm 0,27$ e $36,2 \pm 0,05$ mg/100mL de infusão (Danrong *et al.*, 2009). Para a água destilada o teor de polifenóis obtido foi de $35,3 \pm 0,05$ mg/100mL.

A comparação entre os 6 grupos de infusões considerados (Tabela 2.21) revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$):

Nas infusões de 5 minutos, os chás verdes comerciais (simples e adicionados) apresentaram teores médios de fenólicos significativamente superiores a todos os outros grupos de chás analisados os quais não apresentaram diferenças entre si. Dentro dos chás verdes comerciais o chá verde “Tetley” apresentou um teor significativamente superior aos outros chás.

Nas infusões de 15 minutos, os chás verdes comerciais (simples e adicionados) continuaram a apresentar teores médios de fenólicos significativamente superiores a todos os outros grupos de chás analisados, mas observou-se uma maior diferenciação dos outros grupos. Os chás verdes dos Açores apresentaram um teor de fenólicos intermédio entre os chás verdes adicionados e os chás pretos comerciais. Os chás pretos dos Açores apresentaram um teor significativamente inferior a todos os chás dos Açores. Neste grupo houve o contributo dos chás que apresentaram os teores significativamente mais baixos de entre os chás analisados, sendo o “Gorreana Broken Leaf” o que apresentou o teor mais baixo.

Extracto aquoso (1 hora)

No que respeita ao teor de fenólicos totais determinados nos extractos aquosos (figura 2.18) verificou-se que o valor mais baixo obtido foi o referente ao chá preto dos Açores (“Gorreana – Broken Leaf” - PA3) com um teor de $59,78 \pm 3,28$ mg/ 100 mL de extracto, e o o do chá verde “Tetley” (VC2) com um valor de $324,02 \pm 5,21$ mg/ 100 mL de extracto. Observou-se um grupo de chás verdes com teor de fenólicos muito semelhantes e muito próximos do teor do chá verde “Tetley”: o chá “Gorreana Hysson” (VA3), o chá “Salutem” (VC3) e o chá “Gorreana – Folha Enrolada” (VA1) como os teores $314,44 \pm 10,43$, $313,70 \pm 1,04$ e $312,97 \pm 2,09$ mg/ L de extracto, respectivamente.

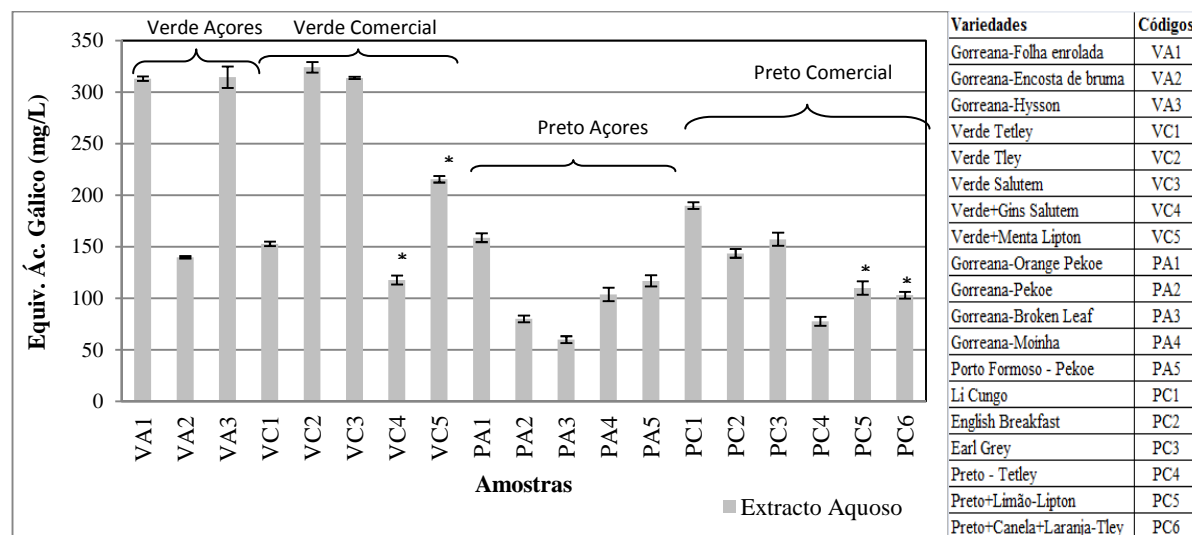


Figura 2. 18 – Teor de fenólicos totais das amostras de extracto aquoso analisadas; * adicionados

O valor médio observado do teor de fenólicos totais foi de $167,88 \pm 87,30$ mg/L de extracto aquoso com um coeficiente de variância de 52,00% (Tabela 2.22). Os extractos de chá verde têm teores mais elevados que os pretos. O grupo que apresentou o valor mais baixo foi o dos chás verdes comerciais adicionados, com um teor de $166,44 \pm 69,21$ mg/L de extracto e o que apresentou o teor mais elevado foi o dos chás dos verdes dos Açores com um teor de $255,69 \pm 100,49$ mg/L de extracto. Os chás pretos apresentaram o teor de fenólicos mais baixo para os chás dos Açores ($103,75 \pm 37,78$ mg/L de extracto) e o mais elevado para os chás comerciais ($141,99 \pm 47,15$ mg/L de extracto).

Tabela 2. 22 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de fenólicos totais dos diferentes extractos aquosos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| Teor de fenólicos totais (mg/L de Extracto Aquoso) | | | | | | | |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 255,69 ^a | 263,44 ^a | 166,44 ^a | 103,75 ^a | 141,99 ^a | 106,39 ^a | 167,88 |
| Desvio Padrão | 100,49 | 96,12 | 69,21 | 37,72 | 47,15 | 4,89 | 87,30 |
| Coeficiente de Variação (%) | 39,30 | 36,49 | 41,58 | 36,36 | 33,21 | 4,59 | 52,00 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

A comparação das médias do teor de fenólicos totais na fase líquida do extracto aquoso entre os 6 grupos não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$), o que indica que, independentemente do tipo de chá, após 1 hora de fervura foi atingido o equilíbrio na transferência de fenólicos para a água. No entanto, dentro de cada grupo, existiu um grande coeficiente de variação (%) e diferenças significativas entre os chás que os compunham.

Verificou-se no entanto que o teor médio de fenólicos totais no extracto aquoso, de $167,88 \pm 52,00$ mg/L, foi menor do que o observado nas infusões, sendo este teor médio de $457,63 \pm 50,58$ mg/L para as infusões de 5 minutos e de $584,72 \pm 42,95$ mg/L para as infusões de 15 minutos. Tal facto poderá possivelmente ser explicado pela ebulição, neste caso de uma hora, diminuir as propriedades sensoriais, ou seja, os óleos essenciais responsáveis pelo aroma de chá são perdidos pela ebulição devido à sua volatilidade. Além disso, um aumento no tempo de ebulição leva a um aumento do teor de taninos, o que provoca a redução de solubilidade da proteína (Rehman *et al.*, 2002).

A ebulição pode ainda promover a combinação dos fenóis com iões, como Ca^{2+} e Mg^{2+} existentes em solução, fazendo com que estes possam ficar parcialmente retidos no resíduo de chá (Danrong *et al.*, 2009).

2.3.3.4 - Composição mineral das infusões de 5 e 15 minutos (Zn, Mg, Al, Cu, Ca, Na, K)

As infusões de 5 e de 15 minutos de chá verde e preto foram estudadas para determinação do conteúdo mineral, por absorção atómica por determinação à chama, para os metais Zn, Mg, Al, Cu, Ca, Na e K obtivemos os resultados, expressos mg/L de chá.

Os limites de detecção e de quantificação para os vários metais foram os seguintes:

| | Na | Mg | Al | K | Ca | Cu | Zn |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Limite de detecção (mg/L) | 0.0855 | 0.0377 | 0.4792 | 0.1882 | 0.3277 | 0.5665 | 0.0473 |
| Limite de quantificação (mg/L) | 0.2924 | 0.1279 | 1.6398 | 0.6374 | 1.1310 | 2.1634 | 0.1727 |

2.3.3.4.1 – Teor de Sódio

No que diz respeito aos valores obtidos para o teor de sódio nas infusões verificou-se que, para as infusões de 5 minutos, os valores variaram entre $2,25 \pm 0,03$ mg de Na/L e $64,74 \pm 0,88$ mg de Na/L, sendo a infusão de chá preto comercial com canela e laranja (PC6) aquela que apresentou um teor significativamente superior em relação aos chás analisados, e a de chá preto “English Breakfast” (PC2) a que apresentou um teor significativamente mais baixo ($p < 0,05$) (Figura 2.19), pouco superior ao determinado por Dambiec e colaboradores (Dambiec *et al.*, 2013), que foi de 1,98 mg/L.

Em relação às infusões de 15 minutos, a infusão que apresentou o maior teor foi a de chá verde comercial com menta (VC5), com um valor médio de $112,04 \pm 4,70$ mg de Na/L, que com o chá verde “Encosta da Bruma” apresentaram teores significativamente superiores a todos os outros chás. O menor valor correspondeu à infusão de chá verde comercial “Tley” (VC2) com $34,56 \pm 1,49$ mg de Na/L de infusão, que com o chá verde “Tley” e o verde com ginseng apresentaram os teores inferiores ($p < 0,05$).

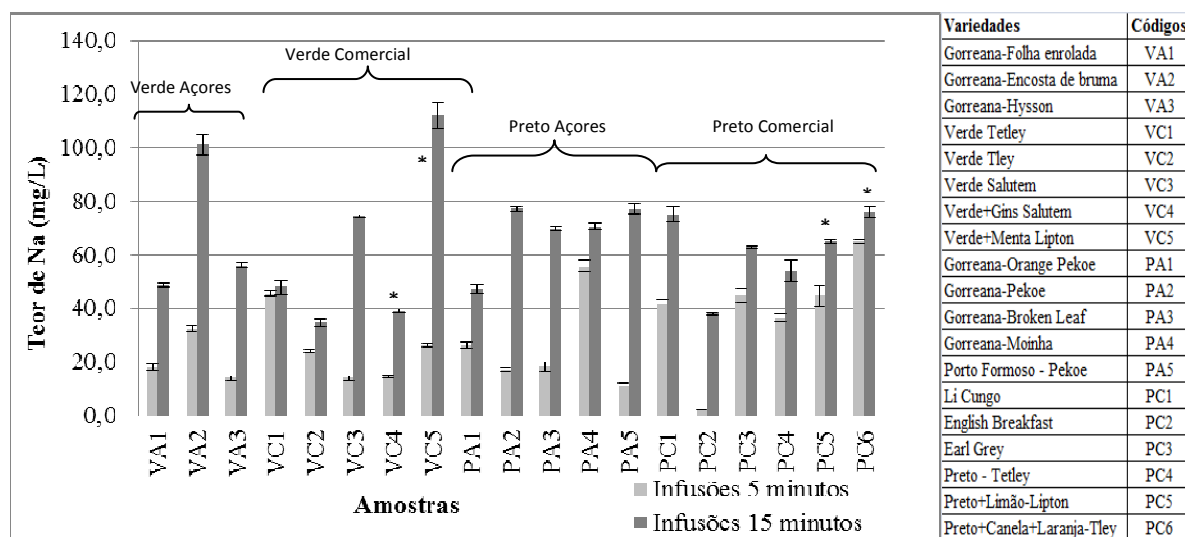


Figura 2. 19 – Teor de sódio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Comparando os valores médios dos teores de sódio nos grupos de chás considerados neste estudo (Tabela 2.23) verificou-se que o teor médio das infusões analisadas foi de $29,10 \pm 16,83$ mg de Na/L para infusões de 5 minutos e de $64,54 \pm 20,50$ mg de Na/L para as infusões de 15 minutos.

Tabela 2. 23 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de sódio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| Teor de Na (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 21,55 ^a | 27,89 ^a | 20,49 ^a | 25,74 ^a | 31,29 ^a | 54,81 ^a | 29,10 |
| Desvio Padrão | 9,70 | 16,06 | 8,30 | 17,65 | 19,66 | 14,05 | 16,83 |
| Coeficiente de Variação (%) | 45,01 | 57,58 | 40,52 | 68,55 | 62,83 | 25,64 | 57,83 |
| Teor de Na (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 68,67 ^a | 52,28 ^a | 75,63 ^a | 68,28 ^a | 57,52 ^a | 70,30 ^a | 64,54 |
| Desvio Padrão | 28,36 | 20,21 | 51,49 | 12,36 | 15,67 | 7,85 | 20,50 |
| Coeficiente de Variação (%) | 41,30 | 38,66 | 68,08 | 18,10 | 27,23 | 11,17 | 31,77 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

A comparação das médias do teor de sódio entre os 6 grupos de infusões de 5 e 15 minutos consideradas (Tabela 2.23) não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). No entanto verificou-se que o grupo de infusões que apresentou menor teor de sódio, para as infusões de 5 minutos, foi o de chás verdes comerciais adicionados com o teor de $20,49 \pm 8,30$ mg/L, enquanto o que apresentou o maior teor foi o grupo de infusões de chás pretos comerciais adicionados como teor de $54,81 \pm 14,05$ mg/L.

Para as infusões de 15 minutos, o grupo de infusões que apresentou maior teor foi o grupo dos chás verdes comerciais adicionados com o teor de $75,63 \pm 51,49$ mg/L, enquanto o que apresentou menor valor foi o dos chás verdes comerciais com o teor de $52,25 \pm 20,21$ mg/L.

Nalguns estudos (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) os valores para os teores de sódio em infusões têm variações entre 8 e 337 mg/L nas infusões de chá verde e entre 6 e 969 mg/L para as infusões de chá preto.

Para infusões de 5 minutos foram relatados teores de 1,08 a 4,92 mg de Na/L de infusão para o chá verde e teores de 0,93 a 1,75 mg de Na/L de infusão para chá preto (Gallaher *et al.*, 2006; Olivier *et al.*, 2012).

2.3.3.4.2 – Teor de Magnésio

Pela observação dos valores obtidos para o teor de magnésio verificou-se que, para as infusões de 5 minutos, as que apresentaram o maior teor foi a de chá verde comercial adicionado com menta (VC5), com um valor médio de $110,55 \pm 2,76$ mg de Mg/L de infusão e, a que apresentou o menor valor foi a infusão de chá preto comercial adicionado com laranja e canela (PC6) com $3,85 \pm 0,05$ mg de Mg/L de infusão (Figura 2.20).

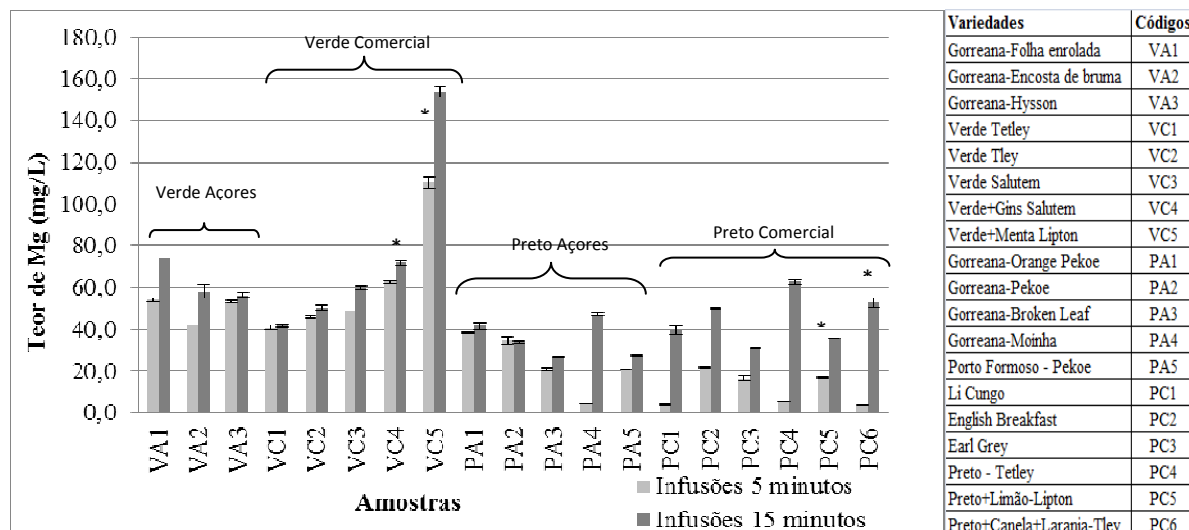


Figura 2. 20 – Teor de magnésio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Em relação às infusões de 15 minutos, aquela que apresentou o maior teor foi a de chá verde comercial adicionado com menta (VC5), com um valor médio de $153,77 \pm 2,45$ mg de Mg/L de infusão e o menor valor foi o da infusão de chá preto dos Açores, “Gorreana – Broken Leaf” (PA3) com um teor de $26,85 \pm 0,35$ mg/L, e com um teor ligeiramente superior o chá preto dos Açores “Porto Formoso, Pekoe” (PA5) com $27,24 \pm 0,26$ mg de Mg/L de infusão.

Para os chás com 5 minutos de infusão, foram relatados (Dambiec *et al.*, 2013) teores de Mg de 33,5 mg/L para o chá “English Breakfast” da marca “Ahmad”, valor superior ao determinado neste estudo (21,6 mg/L) para este tipo de chá mas de outra marca (“Whiteard of Chelsea”).

Tabela 2. 24 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de magnésio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| Teor de Mg (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 49,79 ^b | 45,18 ^{ab} | 86,74 ^c | 23,83 ^{ab} | 12,05 ^a | 10,40 ^a | 34,03 |
| Desvio Padrão | 6,70 | 4,11 | 33,68 | 13,39 | 8,40 | 9,25 | 26,37 |
| Coeficiente de Variação (%) | 13,45 | 9,09 | 38,83 | 56,18 | 69,71 | 89,02 | 77,50 |
| Teor de Mg (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 62,89 ^{ab} | 50,66 ^a | 112,79 ^b | 35,30 ^a | 45,90 ^a | 43,93 ^a | 53,38 |
| Desvio Padrão | 9,64 | 8,87 | 57,96 | 8,90 | 13,75 | 12,40 | 28,02 |
| Coeficiente de Variação (%) | 15,32 | 17,50 | 51,39 | 25,21 | 29,96 | 28,23 | 52,49 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Verificou-se que (Tabela 2.24), para infusões de 5 e de 15 minutos, os chás verdes que apresentaram maiores teores de Mg do que os chás pretos. Entre os chás verdes o grupo de chás que apresentou os teores mais elevados foram os chás verdes comerciais adicionados com teores médios de $86,74 \pm 6,70$ mg de Mg/L e de $112,79 \pm 57,96$ mg de Mg/L, para as infusões de 5 e de 15 minutos, respectivamente. Em relação aos chás pretos, o grupo que apresentou maiores teores de Magnésio foi o de chás dos Açores com um valor de $23,83 \pm 13,39$ mg de Mg/L, para as infusões de 5 minutos, e o de chás comerciais com um valor de $45,90 \pm 13,75$ mg de Mg/L, para as infusões de 15 minutos.

A comparação das médias do teor de magnésio entre os 6 grupos de infusões considerados (Tabela 2.24) revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quer para as infusões de 5 minutos como para as infusões de 15 minutos.

Nas infusões de 5 minutos as infusões de chá verde comercial adicionado apresentaram um teor superior ($p < 0,05$) a todos os grupos de chás analisados, consequência dos chás deste grupo (verde com ginseng e verde menta) terem teores significativamente superiores a todos os outros chás analisados. Os chás pretos dos Açores e os chás verdes comerciais apresentaram um valor intermédio em relação aos chás verdes dos Açores, onde se situam dois chás com teores significativamente superiores ($p < 0,05$) com excepção dos chás verdes adicionados, e os chás pretos comerciais (simples e adicionados).

Nas infusões de 15 minutos, as diferenças entre os grupos foram um pouco esbatidas com a existência de apenas dois grupos com diferenças significativas. Os chás verdes dos Açores apresentaram teores intermédios entre os chás verdes adicionados e os outros grupos de chás analisados.

Os chás verdes adicionados (com ginseng e com menta) e o chá verde “Gorreana Folha Enrolada” apresentaram teores significativamente superiores aos outros chás quer nas infusões de 5 minutos, quer nas infusões de 15 minutos, com excepção do chá verde “Gorreana Hysson” nas infusões de 5 minutos.

Estudos diversos apresentaram teores de Mg para infusões de 5 minutos. Assim para o chá verde chinês foram relatados teores de 5,30 mg/L e para o chá verde original teores de 3,86 mg/L (Gallaher *et al.*, 2006), para chá verde de origem oriental teores de 7,25 mg/L (Olivier *et al.*, 2012), e para o chá preto de Ceilão teores de 8,38 mg/L (Gallaher *et al.*, 2006).

Foram relatadas gamas de variação dos teores de magnésio nas infusões de chás verdes e chás pretos: para os chás verdes de 56 a 488 mg/L e para os chás pretos de 15 a 546 mg/L (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012).

2.3.3.4.3 – Teor de Alumínio

Em relação aos valores obtidos para o teor de alumínio verificou-se que nas infusões de 5 minutos a que apresentou o maior teor foi a de chá verde comercial adicionado com ginseng (VC4), com um valor médio de $57,41 \pm 4,81$ mg de Mg/L de infusão e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá verde comercial “Salutem” (VC3) com $11,73 \pm 0,10$ mg de Mg/L de infusão (Figura 2.21).

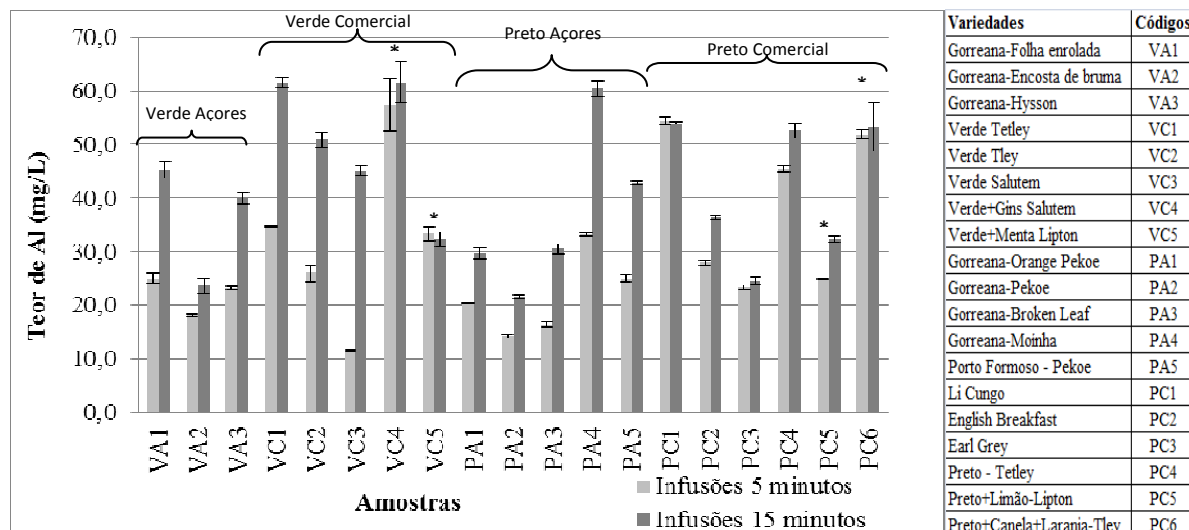


Figura 2. 21 – Teor de alumínio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Em relação às infusões de 15 minutos, um grupo de infusões de chás apresentou os maiores valores determinados, os chás verdes comerciais com ginseng (VC4) e “Tetley” (VC1) e o chá preto dos Açores “Gorreana Moinha” (PA4), com valores médios de $61,54 \pm 3,78$ mg de Al/L de infusão, $61,46 \pm 0,98$ mg de Al/L de infusão e $60,47 \pm 1,36$ mg de Al/L de infusão, respectivamente, e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá preto dos Açores, “Gorreana – Pekoe” (PA2) com um teor de $21,59 \pm 0,45$ mg/L.

O chá “English Breakfast”, para infusões de 5 minutos, apresentou um teor de $27,94 \pm 0,48$ mg/L, superior ao relatado de 6,80 mg/L (Dambiec *et al.*, 2013).

Tabela 2. 25 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de alumínio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| Teor de Al (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 22,12 ^a | 24,16 ^a | 45,39 ^a | 21,88 ^a | 37,76 ^a | 38,39 ^a | 29,83 |
| Desvio Padrão | 3,61 | 11,62 | 17,00 | 7,55 | 14,60 | 18,94 | 13,51 |
| Coeficiente de Variação (%) | 16,30 | 48,09 | 37,45 | 34,52 | 38,67 | 49,34 | 45,28 |
| Teor de Al (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 36,29 ^a | 52,46 ^a | 46,96 ^a | 37,03 ^a | 41,92 ^a | 42,82 ^a | 42,03 |
| Desvio Padrão | 11,26 | 8,32 | 20,63 | 15,14 | 14,05 | 14,80 | 13,22 |
| Coeficiente de Variação (%) | 31,04 | 15,86 | 43,93 | 40,90 | 33,53 | 34,56 | 31,46 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

A comparação das médias do teor de alumínio entre os 6 grupos de infusões considerados (Tabela 2.25) não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Quer nas infusões de 5 minutos, quer nas infusões de 15 minutos, os chás que apresentaram menores teores médios de Al foram os chás dos Açores.

Para as infusões de 5 minutos, o grupo de infusões que apresentou menor valor foi o dos chás pretos dos Açores ($21,88 \pm 7,55$ mg de Al/L), seguido dos chás verdes dos Açores ($22,12 \pm 3,61$ mg de Al/L). Os chás verde com ginseng, os pretos “Li-Cungo” e “Tetley” e o preto com canela e laranja são os chás que apresentaram teores significativamente superiores a todos os chás analisados ($p < 0,05$).

Em relação às infusões de 15 minutos o grupo de infusões que apresentou menor valor foi o dos chás verdes dos Açores ($36,29 \pm 11,26$ mg de Al/L), seguido dos chás pretos dos Açores ($37,03 \pm 15,14$ mg de Al/L). Os chás verde com ginseng, o verde “Tetley” e o preto “Moinha Gorreana” foram os chás que apresentaram teores significativamente superiores a todos os chás analisados ($p < 0,05$), seguidos pelos chás os pretos “Li-Cungo” e “Tetley” e o preto com canela e laranja com teores significativamente superiores aos outros chás, com exceção dos atrás nomeados e do chá verde “Tley”.

Nalguns estudos foram relatados valores para o teor de alumínio de infusões. Para as infusões de chás verdes a gama de teores apresentada foi de 26 a 425 mg/L, enquanto para os chás pretos, a gama de valores foi de 26 a 630 mg/L (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012). Outros estudos apresentaram para o chá verde valores de 0,46 a 3,51 mg/L e para os chás pretos teores de 0,24 a 4,78 mg/L (Olivier *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2008).

2.3.3.4.4 – Teor de Potássio

Em relação aos valores obtidos para o teor de potássio nas infusões verificou-se que, para as infusões de 5 minutos, os valores variaram entre $749,78 \pm 12,41$ mg de K/L e $1219,79 \pm 12,92$ mg de K/L.

A infusão com maior teor foi a de chá verde comercial com menta (VC5), e a de menor valor de chá preto dos Açores, “Porto Formoso – Pekoe” (PA5) (Figura 2.22).

Num estudo determinou-se um teor de $1141,5 \pm 27,0$ mg de K/L para o chá “English Breakfast”, cerca de 3,5 vezes superior ao relatado por alguns autores (Dambiec *et al.*, 2013).

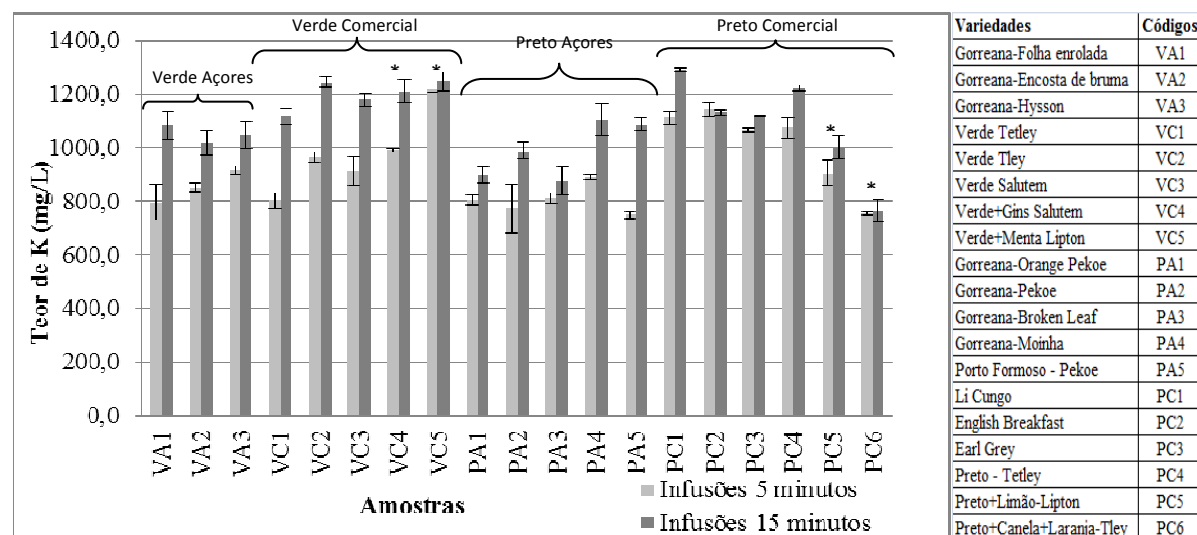


Figura 2. 22 – Teor de potássio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Em relação às infusões de 15 minutos, a que apresentou o maior teor foi a infusão correspondente ao chá preto comercial “Li-Cungo” (PC1), com um valor médio de $1291,68 \pm 7,72$ mg de K/L e a de

menor valor a correspondente à infusão de chá preto comercial com canela e laranja (PC6) com $763,93 \pm 42,58$ mg de Na/L de infusão.

Tabela 2. 26 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de potássio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------|
| Teor de K (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 855,74 ^a | 893,35 ^{ab} | 1105,67 ^c | 806,54 ^a | 1098,77 ^{bc} | 830,73 ^a | 923,57 |
| Desvio Padrão | 61,06 | 83,39 | 161,39 | 54,09 | 35,03 | 106,17 | 142,48 |
| Coeficiente de Variação (%) | 7,13 | 9,33 | 14,60 | 6,71 | 3,19 | 12,78 | 15,43 |
| Teor de K (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 1049,79 ^{ab} | 1179,83 ^b | 1228,66 ^b | 990,48 ^{ab} | 1190,41 ^b | 882,53 ^a | 1085,54 |
| Desvio Padrão | 33,82 | 63,83 | 25,11 | 104,89 | 82,08 | 167,72 | 138,74 |
| Coeficiente de Variação (%) | 3,22 | 5,41 | 2,04 | 10,59 | 6,89 | 19,00 | 12,78 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os valores médios dos teores de potássio nos grupos de chás considerados neste estudo (Tabela 2.26) foram de $923,57 \pm 142,48$ mg de K/L para infusões de 5 minutos e de $1085,54 \pm 138,74$ mg de K/L para as infusões de 15 minutos.

A comparação das médias do teor de potássio entre os 6 grupos de infusões de 5 e 15 minutos consideradas revelou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para infusões de 5 minutos, apesar dos chás dos Açores, verdes e pretos, e o chá preto comercial adicionado não apresentarem diferenças significativas entre eles, revelaram diferenças significativas em relação às infusões de chás verdes adicionados e chás pretos comerciais, que entre eles não revelaram diferenças. Foram no entanto as infusões dos chás dos Açores que apresentaram menor teor de potássio, quer para os chás verdes, quer para os chás pretos e foram as infusões de chás verdes adicionados as que revelaram um maior teor.

Em relação às infusões de 15 minutos, os chás dos Açores (verdes e pretos) apresentaram um teor intermédio entre os chás pretos comerciais adicionados, com teores mais baixos, e com os outros grupos de chás, com teores mais altos.

Foram relatados valores para o teor de potássio para as infusões de 80,93 mg de K/L para o chá verde chinês e de 66,23 mg de K/L para chá verde autêntico (Gallaher *et al.*, 2006). Para infusões de 5 minutos foram relatados teores de 136,50 mg K/L para chá verde do Oriente e de 171,82 mg de K/L para chá preto de Ceilão (Olivier *et al.*, 2012). Os valores apresentados para os teores de sódio em infusões têm variações entre 2 e 1000 mg/L nas infusões de chá verde e entre 3 e 902 mg/L para as infusões de chá preto (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012).

2.3.3.4.5 – Teor de Cálcio

Em relação aos valores obtidos para o teor de cálcio nas infusões verificou-se que, para as infusões de 5 minutos, a que apresentou o maior teor foi a de chá verde comercial com menta (VC5), com um valor médio de $57,72 \pm 3,29$ mg de Ca/L de infusão e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá preto “Earl Grey” (PC3) com $18,98 \pm 0,74$ mg de Ca/L de infusão (Figura 2.23).

Para este tempo de infusão o chá “English Breakfast” apresenta um teor de $30,32 \pm 0,66$ mg de Ca/L de infusão mg/L que foi um pouco inferior ao teor relatado de 38 mg/L (Dambiec *et al.*, 2013),.

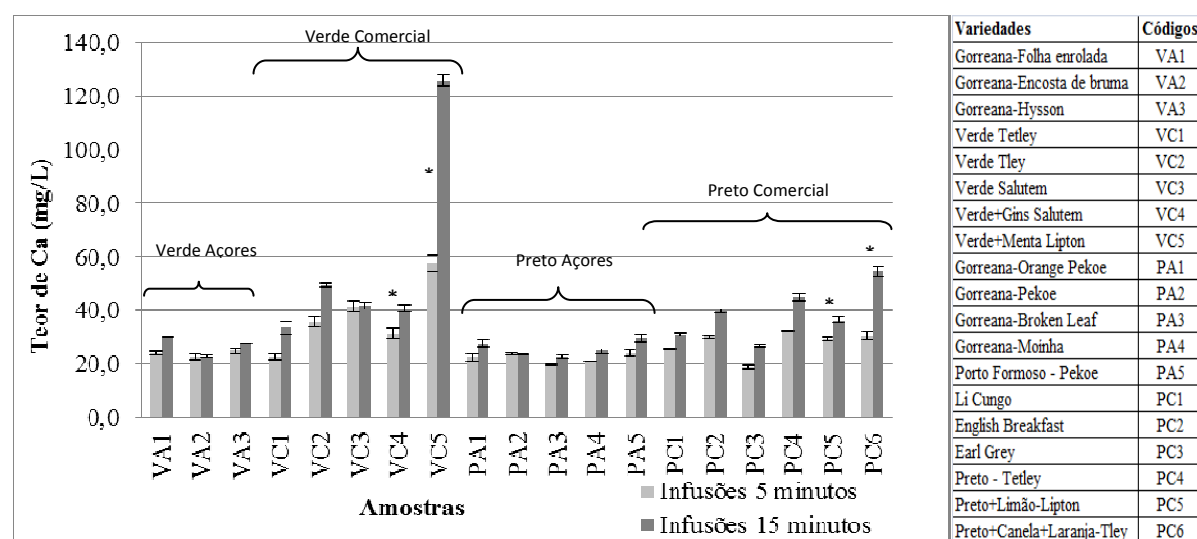


Figura 2. 23 – Teor de cálcio das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Em relação às infusões de 15 minutos, a que apresentou o maior teor foi também a correspondente ao chá verde comercial com menta (VC5), com um valor médio de $125,85 \pm 2,19$ mg de Ca/L de infusão e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá preto dos Açores “Gorreana, Broken Leaf” (PA3) com $23,04 \pm 0,67$ mg de Ca/L de infusão, e com um valor muito próximo as infusões de chá verde “Gorreana, Encosta de Bruma” (VA2) com $23,08 \pm 0,52$ mg de Ca/L de infusão.

Comparando os valores médios dos teores de cálcio nos grupos de chás considerados neste estudo (tabela 2.27) verificou-se que o teor médio de cálcio das infusões analisadas foi de $28,54 \pm 9,13$ mg de Ca/L para infusões de 5 minutos e de $38,82 \pm 23,01$ mg de Ca/L para as infusões de 15 minutos. A variância média das infusões aumentou de 32,00% para 59,28%. Verificou-se ainda que foram as infusões dos Açores, quer de 5 minutos, quer de 15 minutos, que apresentaram menores teores de cálcio. Os chás verdes apresentaram teores de $24,14 \pm 0,97$ e de $27,14 \pm 3,72$ mg de Ca/L de infusão, para as infusões de 5 e 15 minutos, respectivamente e os chás pretos apresentaram teores de $22,47 \pm 1,91$ e de $25,88 \pm 2,83$ mg de Ca/L de infusão, para as infusões de 5 e 15 minutos, respectivamente.

Tabela 2. 27 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cálcio dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| Teor de Ca (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 24,14 ^a | 33,48 ^{ab} | 44,71 ^b | 22,47 ^a | 26,87 ^{ab} | 30,09 ^{ab} | 28,54 |
| Desvio Padrão | 0,97 | 9,60 | 18,39 | 1,91 | 5,97 | 0,80 | 9,13 |
| Coeficiente de Variação (%) | 4,03 | 28,68 | 41,13 | 8,52 | 22,23 | 2,66 | 32,00 |
| Teor de Ca (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 27,14 ^a | 41,85 ^{ab} | 83,32 ^b | 25,88 ^a | 35,84 ^{ab} | 45,59 ^{ab} | 38,82 |
| Desvio Padrão | 3,72 | 7,83 | 60,15 | 2,83 | 8,23 | 12,89 | 23,01 |
| Coeficiente de Variação (%) | 13,71 | 18,71 | 72,19 | 10,93 | 22,96 | 28,27 | 59,28 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Nas infusões de 5 e 15 minutos, apesar dos chás dos Açores, verdes e pretos, não apresentarem diferenças significativas, revelaram teores significativamente inferiores aos chás verdes adicionados ($p < 0.05$). Tal facto deveu-se ao facto do chá verde com menta apresentar teores significativamente superiores a todos os chás analisados.

Foram relatados (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012) valores que têm variações entre o não detectável até $3,7 \cdot 10^5$ mg/L nas infusões de chá verde e valores desde o não detectável até $4,60 \cdot 10^5$ mg/L para as infusões de chá preto.

Para infusões de 5 minutos, (Gallaher *et al.*, 2006) valores, para chás verdes, de 3,73 mg/L para o chá chinês e de 2,25 mg/L para chá autêntico, e teores de 4,06 mg/L para o chá verde oriental e de 2,33 mg/L para o chá preto de Ceilão (Olivier *et al.*, 2012). Para infusões de 15 minutos, valores de chá verde que variam entre os $1,45 \pm 0,08$ mg/L e os $6,10 \pm 0,13$ mg/L e para os chás pretos valores que variam entre $1,62 \pm 0,04$ e $2,39 \pm 1,53$ mg/L (Malik *et al.*, 2008).

2.3.3.4.6 – Teor de Cobre

O cobre é constituinte de diversas enzimas que participam na síntese de transmissores nervosos e de proteínas do tecido conjuntivo. Participa ainda no mecanismo imunitário (Almeida & Afonso, 1997). No que respeita aos valores obtidos para o teor de cobre nas infusões verificou-se que, para as infusões de 5 minutos, a que apresentou o maior teor foi a de chá preto dos Açores “Gorreana, Orange Pekoe” (PA1), com um valor médio de $0,73 \pm 0,03$ mg de Cu/L de infusão e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá preto dos Açores “Gorreana, Pekoe” (PA2) com $0,15 \pm 0,00$ mg de Cu/L de infusão (Figura 2.24).

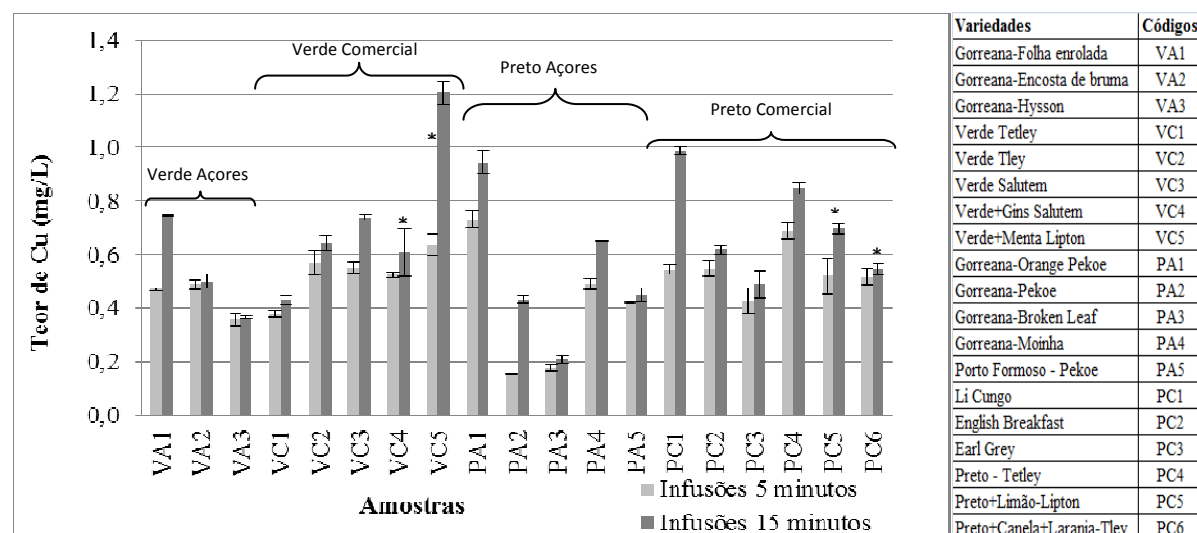


Figura 2. 24 – Teor de cobre das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Em relação às infusões de 15 minutos, a que apresentou o maior teor foi a de chá verde comercial adicionado com menta (VC5), com um valor médio de $1,20 \pm 0,04$ mg de Cu/L de infusão e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá preto dos Açores “Gorreana, Broken Leaf” (PA3) com $0,49 \pm 0,05$ mg de Cu/L de infusão.

Para a infusão de 5 minutos de “Earl Grey” foi relatado um teor de 0,09 mg de Cu/L de chá (Al-Oud *et al.*, 2003), inferior ao teor determinado neste estudo que foi de $0,43 \pm 0,04$ mg de Cu/L de infusão.

Tabela 2. 28 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cobre dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| Teor de Cu (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 0,44 ^a | 0,50 ^a | 0,58 ^a | 0,40 ^a | 0,55 ^a | 0,52 ^a | 0,48 |
| Desvio Padrão | 0,07 | 0,10 | 0,08 | 0,24 | 0,11 | 0,00 | 0,15 |
| Coeficiente de Variação (%) | 16,02 | 21,03 | 13,63 | 60,41 | 19,19 | 0,41 | 30,24 |
| Teor de Cu (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 0,54 ^a | 0,60 ^a | 0,91 ^a | 0,54 ^a | 0,74 ^a | 0,62 ^a | 0,64 |
| Desvio Padrão | 0,19 | 0,16 | 0,42 | 0,28 | 0,22 | 0,11 | 0,24 |
| Coeficiente de Variação (%) | 35,83 | 25,97 | 46,62 | 51,18 | 30,21 | 17,38 | 37,51 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Comparando os teores médios dos grupos de infusões considerados na Tabela 2.28 verificou-se que os grupos que apresentaram menor teor de cobre, quer para as infusões de 5 minutos, quer para as infusões de 15 minutos, foram os grupos de chás dos Açores, verdes e pretos. Isto apesar da comparação destas médias entre os 6 grupos de infusões de 5 e 15 minutos considerados não terem revelado diferenças significativas ($p < 0,05$).

Nas infusões de 5 minutos, os chás preto “Orange Pekoe” e “Gorreana” e preto “Tetley” apresentaram teores significativamente superiores a todos os chás analisados, enquanto os chás pretos “Gorreana Pekoe” e “Broken Leaf” apresentaram os teores significativamente inferiores. Nas infusões de 15 minutos, foi o chá verde com menta que apresentou o teor significativamente mais alto em relação aos chás analisados e o chá preto “Broken Leaf Gorreana” que apresentou o teor significativamente mais baixo de todos os chás analisados, com exceção do chá verde “Hysson Gorreana”.

Estes valores foram inferiores aos apresentados por alguns autores, os quais variaram de 27 a 540 mg/L para os chás verdes e de 103 a 748 mg/L para os chás pretos (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012).

Para infusões de 5 minutos, valores entre 0,12 e 0,36 mg/L, tendo as infusões sido preparadas colocando 5 gramas de chá em 200 mL de água fervente (Mehra & Baker, 2007). Outros estudos apresentam outras gamas de valores. Para os chás verdes valores que variam de 0,036 a 0,35 mg/L e para os chás pretos teores que variam de 0,04 a 0,09 mg/L (Al-Oud *et al.*, 2003; Gallaher *et al.*, 2006; Olivier *et al.*, 2012).

Os valores obtidos para o teor de cobre foram semelhantes aos apresentados por outro estudo, com infusões de 15 minutos e preparadas colocando 1,0 grama de chá em 50 mL de água fervente, e cujos valores variaram entre $0,079 \pm 0,011$ mg/L e $0,166 \pm 0,069$ mg/L (Malik *et al.*, 2008).

As diferenças destes valores para o teor de cobre variam de infusão para infusão devido quer à preparação (razão chá:água) quer devido ao tempo de infusão.

2.3.3.4.7 – Teor de Zinco

O zinco é um elemento essencial na formação de numerosas proteínas, participando no mecanismo proteico, nomeadamente, na síntese de ADN durante a divisão celular, na síntese do colagénio e da insulina (Almeida & Afonso, 1997).

Em relação aos valores obtidos para o teor de zinco verificou-se que nas infusões de 5 minutos a que apresentou o maior teor foi a de chá verde dos Açores, “Gorreana – Folha Enrolada” (VA1), com um valor médio de $1,51 \pm 0,01$ mg de Zn/L de infusão e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá preto dos Açores “Gorreana, Broken Leaf” (PA3) com $0,85 \pm 0,00$ mg de Zn/L de infusão (Figura 2.25). Em relação às infusões de 15 minutos, a que apresentou o maior teor foi a de chá verde dos Açores, “Gorreana – Folha Enrolada” (VA1), com um valor médio de $2,32 \pm 0,04$ mg de Zn/L de infusão e o menor valor foi apresentado pela infusão de chá preto comercial “Tetley” (PC4) com um teor de $0,90 \pm 0,05$ mg/L, e com um teor ligeiramente superior o chá preto dos Açores “Gorreana, Broken Leaf” (PA3) com $0,94 \pm 0,02$ mg de Zn/L de infusão.

Em relação a infusões de 5 minutos as determinações para o chá “Earl Grey” que indicaram teores de 0,36 mg/L (Al-Oud *et al.*, 2003) e para o chá “English Breakfast” da marca “Ahmad”, com teores de 0,20 mg/L (Dambiec *et al.*, 2013). Estes valores foram inferiores aos obtidos neste estudo de 0,93 mg/L para o chá “Earl Grey” e de 1,24 mg/L para o chá “English Breakfast”.

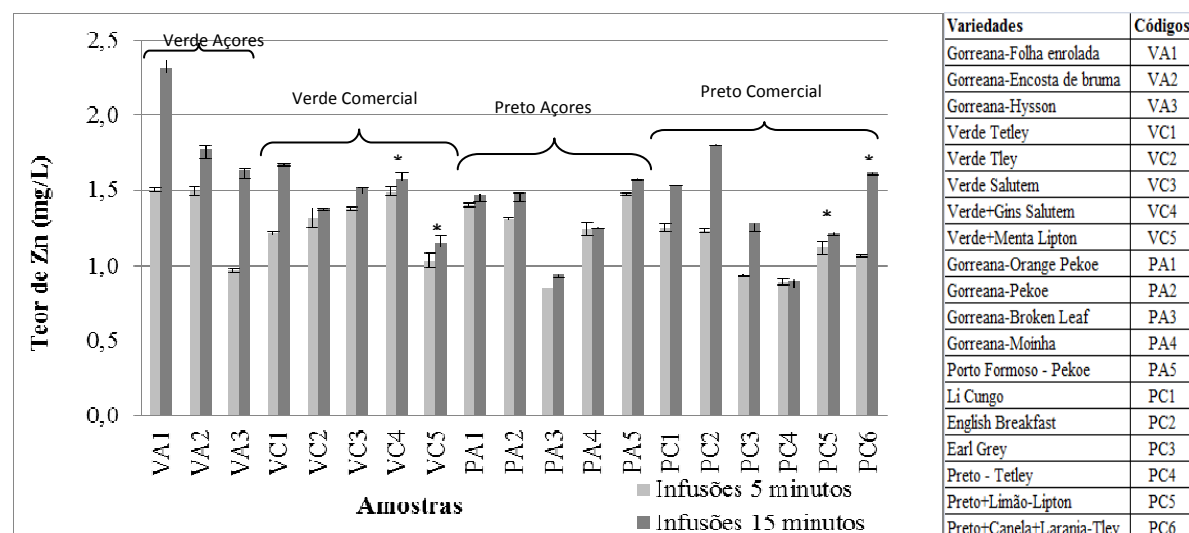


Figura 2. 25 – Teor de zinco das amostras de infusões de 5 e 15 minutos analisadas; * adicionados

Verificou-se (Tabela 2.29) que, em média, os chás verdes que apresentaram maiores teores de Zn que os chás pretos nas infusões de 5 minutos. Para as infusões de 15 minutos estas diferenças deixaram de existir.

Tabela 2. 29 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de zinco dos diferentes tipos de infusões, de 5 e 15 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------|
| Teor de Zn (mg/L de chá) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 1,32 ^a | 1,30 ^a | 1,26 ^a | 1,26 ^a | 1,08 ^a | 1,09 ^a | 1,22 |
| Desvio Padrão | 0,31 | 0,08 | 0,32 | 0,24 | 0,19 | 0,04 | 0,21 |
| Coeficiente de Variação (%) | 23,16 | 6,21 | 25,67 | 19,39 | 17,76 | 3,23 | 17,60 |
| Teor de Zn (mg/L de chá) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 1,91 ^a | 1,52 ^a | 1,36 ^a | 1,34 ^a | 1,38 ^a | 1,42 ^a | 1,48 |
| Desvio Padrão | 0,36 | 0,15 | 0,30 | 0,25 | 0,38 | 0,28 | 0,33 |
| Coeficiente de Variação (%) | 18,92 | 9,95 | 22,11 | 18,97 | 27,85 | 19,93 | 22,06 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Quer nas infusões de 5 minutos, quer nas infusões de 15 minutos (Tabela 2.29) o grupo de chá que apresentou maiores teores de zinco, foi o grupo dos chás verdes dos Açores com $1,32 \pm 0,31$ mg/L e $1,91 \pm 0,36$ mg/L, respectivamente.

Para as infusões de 5 minutos, o grupo que apresentou menor teor de zinco foi o de chás pretos comerciais, com um valor médio de $1,08 \pm 0,19$ mg/L, enquanto para as infusões de 15 minutos, o

grupo que apresentou menor teor de zinco foi o de chás pretos dos Açores com um valor médio de $1,34 \pm 0,25$ mg/L.

A comparação das médias do teor de ferro entre os 6 grupos de extractos considerados não revelou diferenças significativas ($p < 0,05$), quer para as infusões de 5 minutos, quer para as infusões de 15 minutos. No entanto, cada grupo apresentou chás com o teores significativamente diferente o que se refletiu no elevado coeficiente de variância.

Os valores obtidos neste estudo estão de acordo com os que foram apresentados por alguns autores para o teor de zinco (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012). Estes autores apresentaram teores de ferro para as infusões que variam de 1 a 888 mg/L para os chás verdes e de 1 a 780 mg/L para os chás pretos.

Outros estudos apresentaram teores para infusões de 5 minutos para os chás verdes e pretos: para os chás verdes teores de Zn de 0,57 mg/L (Al-Oud *et al.*, 2003) e de 0,138 mg/L (Gallaher *et al.*, 2006) para o chá chinês, de 0,16 mg/L para o chá de origem oriental (Olivier *et al.*, 2012) e de 0,091 mg/L para o chá original (Gallaher *et al.*, 2006), para o chá preto de Ceilão foi determinado o teor de 0,15 mg/L.

2.4 - Conclusões

Como referido anteriormente, os chás incluídos neste trabalho foram agrupados em função do tipo de chá, presença de aditivos e origem geográfica, e os diferentes grupos homogêneos foram comparados entre si quanto às variáveis em estudo.

Comparando as várias folhas de chás analisadas, verificou-se que as de chás verdes e pretos açorianos apresentaram menor teor de humidade mas maior teor de cinzas. Tal facto deverá ser devido aos chás açorianos se apresentarem sobre a forma de folhas secas, enquanto os chás comerciais, adicionados ou não, se apresentam sob a forma de saquetas e, como tal, triturados. Este facto explica também o menor teor de fenólicos que, por serem extraídos a partir das folhas têm menor superfície de contacto entre o solvente e o chá do que no caso dos chás comerciais.

Devido ao solo apresentar diferentes biodisponibilidades dos elementos, as folhas de chás podem variar fortemente as suas concentrações de Al, Zn, Mg, K, Na, Cu, e Ca. Quando as folhas são utilizadas para a preparação de chá, apenas o componente de elementos extraível está disponível para os seres humanos. Estudos diversos demonstraram que apenas uma pequena fracção da quantidade total de elementos presentes nas folhas de chá fica disponível nas infusões e geralmente representa menos de 1 % da ingestão diária total para os seres humanos (Pytlakowska *et al.*, 2012).

Os teores do fósforo e azoto dependem do local de cultivo e no caso dos chás dos Açores as zonas de cultivo são as encostas voltadas para o mar (Oceano Atlântico), de origem vulcânica com grande capacidade de retenção de fósforo e enriquecidas em azoto (Pacheco, 2005).

Neste estudo sobre o chá, o elemento mais abundante entre os macroelementos foi o K, seguido dos outros macroelementos analisados Ca, Mg Na e Al. No caso das infusões os macroelementos foram seguidos pelos microelementos, nomeadamente, Zn e Cu.

As folhas de chá e as infusões de 5 e 15 minutos diferiram em relação às sequências de concentração de elementos minerais, nomeadamente dos macroelementos. Assim, para as folhas e, por ordem decrescente de quantidade, $K > Ca > Mg > Al > Na$, enquanto para as infusões de 5 minutos $K > Mg > Al > Na > Ca$ e para as infusões de 15 minutos $K > Na > Mg > Al > Ca$.

Nas infusões de 5 minutos verificou-se o Al e o Cu estavam relacionados, que o K e Ca estavam fortemente relacionados com o seu extracto seco. No entanto, em relação às infusões de 15 minutos, só o K estava fortemente relacionado com o seu extracto seco.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as várias categorias de chá (verde Açores, verde comercial, verde comercial adicionado, preto Açores, preto comercial, preto comercial adicionados) quanto a alguns parâmetros: humidade, cinzas, sódio e potássio (folhas de chá); zinco, alumínio, cobre e sódio (infusões de 5 minutos); peso seco, zinco, alumínio, cobre e sódio (infusões de 15 minutos); sólidos totais e fenólicos totais (extracto aquoso).

Verificou-se que os parâmetros extracto seco, cinzas, fenólicos totais, Mg, Al, K, Ca e Zn das infusões de 5 min estavam fortemente correlacionados com os mesmos parâmetros nas infusões de 15 min ($p < 0,01$), o que evidenciou a cinética do processo de dissolução destes componentes; no entanto o mesmo não ocorreu para os sólidos totais e fenólicos totais do extracto aquoso.

Os parâmetros dos teores de fenólicos totais, Na, Al, Ca e Zn das infusões de 15 minutos estavam fortemente relacionados com os mesmos parâmetros nas folhas de chá e o Mg relacionado com o mesmo parâmetro nas folhas ($0,01 < p < 0,05$), no entanto o mesmo não aconteceu com o K.

Embora os tempos de infusão recomendados variem entre 30 segundos a 10 minutos ou mais para diferentes infusões e, tradicionalmente, alguns destes chás são fervidos (Olivier *et al.*, 2012), foi utilizado, além dos 15 minutos, um tempo padrão de 5 minutos. As duas razões principais foram: em primeiro lugar, para garantir a normalização dos resultados e, em segundo lugar, para determinar os níveis de ingestão de minerais do consumidor comum que, raramente dispõe de tempo para ferver as infusões ou infundir os chás para mais do que uns poucos minutos antes do consumo. Deve, contudo, notar-se que as diferenças de tempo de infusão afectam a biodisponibilidade de minerais. No entanto, a solubilidade dos elementos é mais elevado nos primeiros 5 minutos de infusão (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012).

As propriedades nutricionais do consumo de chá podem ser avaliadas. As doses diárias das infusões de 5 minutos, tempo mais comum de preparação, calculadas para os metais estudados mostraram que as infusões de chá poderiam contribuir para a ingestão diária de metais (DRI) (Tabela 2.30).

Tabela 2. 30 - A ingestão esperada calculada de elementos com infusão de 5 minutos de chá e dose diária média recomendada de ingestão (DRI) para homens e mulheres de 19 a 50 anos de idade (Dambiec et al, 2013; Gallaher et al, 2006; Olivier et al, 2012; in <http://www.iom.edu/Activities/Nutrition/SummaryDRIs/DRI-Tables.aspx>)

| Elemento | teor médio de 100 mL de infusão (5 minutos) | DRI (mg/dia): Homens | Máximo diário (mg/dia): homens | DRI (mg/dia) (mg/dia): Mulheres | Máximo diário: mulheres |
|----------|---|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Na | 2,91 | 1500 | 2300 | 1500 | 2300 |
| Mg | 3,40 | 400-420 | 350 | 310-320 | 350 |
| Al | 2,98 | 5 | | 5 | |
| K | 92,36 | 4700 | --- | 4700 | --- |
| Ca | 2,85 | 1000 | 2500 | 1000 | 2500 |
| Cu | 0,048 | 0,9 | 10 | 0,9 | 10 |
| Zn | 0,12 | 11 | 40 | 8 | 40 |

Estes valores proporcionam, por cada 100 mL de infusão preparada (0,5g de chá/50ML de água), uma média de 0,2% dos requisito diários do corpo humano para Na, 1,0% de Mg, 59,6% de Al, 2,0% de K, 0,3% de Ca, 5,3% de Cu e 1,3% para o Zn.

A composição da água desempenha um papel importante na extracção química de folhas de chá e consequentemente na composição da infusão de chá. No presente estudo, as infusões de chá foram preparadas usando água destilada. No entanto, o chá para os consumidores será preparado com água a partir de várias fontes e, portanto, contendo diferentes concentrações elementares o que pode afectar as concentrações elementares da infusão de chá.

Além disso, a variação do volume de chá preparado tem efeitos sobre a concentração. Aumentando o volume de preparação da infusão sem alteração da razão chá:água, aumenta a eficiência da extracção dos compostos bioactivos, devido a que o arrefecimento de volumes maiores é mais demorado que o arrefecimento de menores volumes.

Capítulo 3 – Caracterização da actividade antioxidante de chás dos Açores e seu perfil dos compostos fenólicos

3.1 – Introdução

As infusões de chá preparado a partir das folhas da planta *Camellia sinensis* têm sido consumidas há quase 50 séculos (Khan *et al.*, 2007). O número de consumidores de chá preto é superior ao número de consumidores de chá verde mas, nos últimos tempos, o consumo de chá verde tem aumentado, especialmente no Ocidente, possivelmente devido aos numerosos estudos que indicam que o consumo regular de chá verde apresenta uma ampla variedade de benefícios para a saúde. Alguns efeitos positivos associados ao consumo regular de chá e em particular de chá verde são: a redução do risco de doenças cardiovasculares, prevenção de certos tipos de cancro, redução da inflamação do intestino e do fígado, prevenção e melhoria de doenças neurodegenerativas e diabetes e até mesmo promoção de perda de peso (Dufresne & Farnworth, 2001).

Alguns estudos epidemiológicos sugerem que o consumo regular de chá verde e preto está associado a bons índices de saúde humana (Rietveld *et al.*, 2003).

O estudo dos componentes individuais do chá, da sua actividade antioxidante e do seu modo de acção a nível celular, pode contribuir para esclarecer o seu papel protector no desenvolvimento de cancro, doenças cardiovasculares e outras patologias. A utilização de componentes de chá como elementos nutracêuticos na formulação de alimentos funcionais tem sido também abordada em diversos trabalhos (Dufresne & Farnworth, 2001).

O chá pode ser considerado um alimento funcional uma vez que, além do seu valor nutricional contém substâncias que podem diminuir os riscos ou minimizar os efeitos de algumas doenças crónicas, podendo portanto influenciar a qualidade e expectativa de vida dos seus consumidores (Senger *et al.*, 2010).

A composição do chá e portanto as suas propriedades antioxidantes dependem de inúmeras variáveis como o tipo de chá, as condições de produção, (época, clima, solo), as práticas de horticultura (mecânica ou manual) e as diferentes tecnologias utilizadas na produção do chá (Carloni *et al.*, 2013).

Pode-se referir que as propriedades benéficas atribuídas ao chá estão relacionadas com a sua actividade: antioxidante (Dufresne & Farnworth, 2001; Rietveld *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2007; Staszewski *et al.*, 2011; Carloni *et al.*, 2013), anticarcinogénica (Dufresne & Farnworth, 2001; Pastore *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2009), antimutagénica (Kuroda *et al.*, 1999; Taneja *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009), antidiabética (Khan *et al.*, 2007), antimicrobiana (Wu *et al.*, 2007; Almajano *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2008; Staszewski *et al.*, 2011), hipocolesterolémica (Yang *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2009; Mohammed *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2009), protectora da saúde oral (Shokrzadeh *et al.*, 2006), antiobesidade (Lamarão *et al.*, 2009) e protectora de doenças vasculares (Dufresne & Farnworth, 2001; Faria *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* e *in vivo* fornecem fortes evidências de que os polifenóis derivados do chá podem reduzir a incidência e efeitos de várias doenças crónicas. De entre os polifenóis do chá verde, a epigallocatequina-3-galato é a mais abundante e tem por isso sido indicada como responsável por grande parte da capacidade de promoção da saúde do chá (Khan *et al.*, 2007).

3.1.1 - Actividade antioxidante dos chás

Os antioxidantes são compostos químicos que têm a capacidade de impedir ou retardar a oxidação de diversas substâncias quer componentes dos alimentos, quer biomoléculas dos organismos. A oxidação de moléculas com relevância fisiológica é um dos processos metabólicos associado ao desencadear de diversas doenças, pelo que a inibição desta reacção deverá ter um efeito de redução dessas patologias. Outras das funções dos antioxidantes é facilitar o uso do oxigénio pelas mitocôndrias celulares, ajudando a reduzir o efeito do stress oxidativo e a falta de oxigénio formando complexos que reduzem as reacções produtoras de radicais livres (moléculas/iões instáveis de alta energia com electrões desemparelhados e com grande tendência a reagir com outros compostos) e consequentemente desempenhando uma função fundamental na prevenção de doenças crónicas não transmissíveis (Zamora, 2007).

A actividade antioxidante dos compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de oxidação-redução, o que lhes permitem agir como agentes redutores, doadores de hidrogénio, e supressores do oxigénio singlete. Além disso, eles têm um potencial de quelação de iões metálicos que podem actuar como oxidantes de biomoléculas (Atoui *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006).

Os polifenóis das plantas são uma grande família de compostos com diferentes estruturas químicas consequentemente com diferentes propriedades biológicas. Os flavonóides são uma das classes de polifenóis mais estudadas actualmente, pois considera-se que apresentam uma bioactividade específica bastante elevada quando comparada com outros polifenóis (Kerio *et al.*, 2013).

Os flavonóides constituem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. São das substâncias mais largamente distribuídas no reino vegetal, constituindo os pigmentos responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha das plantas (Ghedira, 2005). São consumidos em grandes proporções sendo encontrados na fruta, vegetais, legumes, mel e bebidas, como por exemplo, o vinho tinto, os chás e infusões, o café ou a cerveja.

De acordo com Patrícia Carloni e sua equipa, a actividade antioxidante do chá diminui na ordem: chá verde > chá oolong > chá preto, embora as características particulares de cada chá ou a natureza do teste utilizado possam inverter pontualmente esta ordem (Carloni *et al.*, 2013). Por exemplo, a actividade antioxidante de diferentes chás avaliada pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil) diminui pela seguinte ordem: chá verde > chá rooibos não fermentado > chá rooibos fermentado > chá rooibos semi-fermentado > chá preto > chá oolong, ou seja, a actividade anti-radicalar do chá preto foi superior à do chá oolong (Gadow *et al.*, 1997).

O armazenamento de chás frescos (não fermentado, semi-fermentado e fermentado) à temperatura de -20°C durante cerca de um ano provocou uma diminuição generalizada da sua capacidade antioxidante expressa em equivalentes de Trolox (TEAC), sobretudo para as amostras de chá não fermentado (chá verde) e chá semi-fermentado; assim, após este armazenamento o chá fermentado (chá preto) apresentava uma capacidade antioxidante superior aos restantes chás apesar de nos chás frescos esta relação ser inversa. Este comportamento pode ser a consequência da maior susceptibilidade dos polifenóis do chá verde às condições oxidativas quando comparados com os polifenóis mais abundantes no chá preto (Bancirova, 2010).

Muitos estudos *in vitro* mostram que os flavonóides presentes no chá têm forte actividade antioxidante e propriedades quelantes de metais e, portanto, podem proteger as células e os tecidos contra os radicais livres de oxigénio e outras espécies oxidantes (Rietveld *et al.*, 2003).

Esta acção antioxidante dos flavonóides bem como dos restantes compostos bioactivos do chá, pode ocorrer ao nível do trato digestivo, ou noutros tecidos, após a sua absorção e mobilização no plasma sanguíneo. Um número considerável de estudos relativos ao efeito biológico de chá verde e preto em humanos demonstra um aumento significativo na capacidade antioxidante do plasma em seres humanos aproximadamente uma hora após o consumo de quantidades moderadas de chá (1 a 6 copos / dia). Há indicações de que o potencial antioxidante do sangue conduz à redução de danos oxidativos em macromoléculas, tais como o DNA, proteínas e lípidos (Rietveld *et al.*, 2003).

Num estudo realizado por Chan e colaboradores (Chan *et al.*, 2010) foram determinadas as propriedades antioxidantes de treze chás de ervas de origem tropical e cinco chás de ervas de origem temperada, tendo como comparação os chás verde, oolong e preto de *Camellia sinensis*, que foram utilizados como controlo positivo. As propriedades estudadas foram o teor de fenólicos totais (TPC), a actividade anti-radicalar (AEAC), o poder de redução de ferro (FRAP) e o poder de quelação do ião ferroso (CEC50). Os chás foram classificados de acordo com os valores médios de TPC. Verificou-se que as propriedades antioxidantes dos chás de ervas tropicais eram mais diversificadas, e mais variáveis do que as dos chás de ervas temperados (Tabela 3.1). Os chás de ervas tinham, geralmente, valores de actividade antioxidante mais baixos do que os chás de *Camellia sinensis*, com excepção dos chás de murta limão, goiaba e chá de orégãos, com actividade antioxidante comparável à do chá preto. A capacidade de quelação dos iões ferro dos chás de hortelã e de hortelã-pimenta foi significativamente mais forte do que todos os chás de *Camellia sinensis* (Chan *et al.*, 2010).

Tabela 3. 1 - Compostos fenólicos totais (TPC) expressos em equivalentes de ácido gálico (GAE), Capacidade Antioxidante expressa em equivalentes de ácido ascórbico (AEAC), Poder redutor do ferro (FRAP) e Capacidade quelante EC50 (CEC50) de chás de ervas de zonas tropicais e temperadas (Chan *et al.*, 2010)

| Tipo de chá | TPC (mg GAE/100 g) | AEAC (mg AA/100 g) | FRAP (mg GAE/g) | CEC ₅₀ (mg/mL) |
|--|-----------------------|-----------------------|--------------------|------------------------------|
| Chá de ervas tropicais | | | | |
| Murta limão (<i>Backhousia citriodora</i>) | 7560±126 | 13 600±792 | 61±0.6 | 1.2±0.2 |
| Goiaba (<i>P. guajava</i>) | 5930±584 | 7430±752 | 35±2.7 | 1.2±0.2 |
| Legundi (<i>Vitex negundo</i>) | 5420±404 | 4900±549 | 30±2.0 | 1.9±0.1 |
| Rooibos (<i>A. linearis</i>) | 3750±235 | 3020±456 | 20±0.4 | 4.7±1.2 |
| Jin Hua yin (<i>Lonicera japonica</i>) | 3630±169 | 3850±224 | 21±0.5 | 2.0±0.2 |
| Misai kucing | 2780±71 | 4160±362 | 22±0.9 | 1.1±0.5 |
| Pegaga (<i>Centella asiatica</i>) | 2040±214 | 1340±613 | 12±1.2 | 2.7±0.1 |
| Mas cotek (<i>Ficus deltoidea</i>) | 2020±87 | 1080±66 | 5.9±0.3 | 1.0±0.0 |
| Cabaço amargo (<i>Momordica charantia</i>) | 1430±30 | 1100±63 | 10±0.4 | 2.0±0.1 |
| Getto (<i>Alpinia zerumbet</i>) | 854±21 | 536±56 | 3.5±0.3 | 0.9±0.1 |
| gelugor Asam (<i>Garcinia atroviridis</i>) | 806±94 | 262±15 | 2.9±0.2 | >7.0 |
| Rang jeud (<i>T. laurifolia</i>) | 805±50 | 591±29 | 4.3±0.5 | 4.0±0.5 |
| Limão (<i>C. citratus</i>) | 644±20 | 354±31 | 3.1±0.2 | 4.7±0.3 |
| Chá de ervas de zonas temperadas | | | | |
| Orégãos (<i>Origanum vulgare</i>) | 5860±379 | 7240±309 | 49±1.6 | 0.8±0.2 |
| Hortelã (<i>Mentha piperita</i>) | 4350±20 | 4430±310 | 31±0.4 | 0.3±0.0 |
| Menta (<i>Mentha spicata</i>) | 4210±139 | 6040±311 | 37±0.3 | 0.4±0.1 |
| Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>) | 2810±89 | 3090±97 | 20±1.2 | 2.1±0.5 |
| Camomila (<i>Matricaria recutita</i>) | 1370±37 | 966±52 | 8.1±0.2 | 3.3±0.1 |

Tabela 3.1 (Continuação)

| Tipo de chá | TPC (mg GAE/100 g) | AEAC (mg AA/100 g) | FRAP (mg GAE/g) | CEC50 (mg/mL) |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Chás verdes, oolong e pretos | | | | |
| Chá verde | 14,120±1810 | 25 000±2780 | 143±11 | 1.8±0.3 |
| Chá verde | 11,370±1480 | 25 000±2780 | 84±11 | 1.4±0.1 |
| Ti Kuan Yin | 9090±457 | 16 170±2480 | 69±4.2 | 1.9±0.2 |
| Etiqueta amarela | 8490±803 | 11 550±1150 | 53±3.0 | 1.7±0.1 |
| Cha Wang | 7500±462 | 14 450±3046 | 59±2.3 | 1.8±0.5 |
| Bukit Cheeding | 7410±120 | 10 300±563 | 53±3.0 | 1.0±0.2 |
| Cameron Highlands | 6060±543 | 7510±1260 | 36±2.4 | 1.5±0.2 |

O efeito da temperatura e tempo de infusão na actividade antioxidante dos chás foi estudado por Venditti e sua equipa (Venditti *et al.*, 2010) mediante avaliação do seu conteúdo em polifenóis e da sua actividade de quelação de metais. As infusões de chá foram efectuadas utilizando água quente (90 °C, 7 minutos) e água fria (temperatura ambiente, 2 horas). A actividade antioxidante, nomeadamente o teor de fenólicos totais, não mostraram diferenças significativas entre chás quentes ou frios, excepto no caso do chá branco, onde os valores significativamente mais elevados foram obtidos para a infusão em água fria. A actividade antioxidante dos chás obtidos com água quente e fria correlacionou-se bem com o seu conteúdo fenólico total.

Quando um chá verde é tratado com enzimas tanase, estas actuam sobre os polifenóis complexos do chá (p.ex. galato de epigallocatequina, galato de epicatequina e ácido clorogénico), hidrolizando a ligação “éster” (éster galoil de uma unidade de álcool ou do ácido gálico). Verifica-se que o poder antioxidante do chá biotransformado aumenta 55% em relação ao mesmo chá não tratado, quando avaliado o poder antioxidante por ensaios de DPPH e ORAC. Estes resultados fornecem dados relevantes sobre o potencial da aplicação de enzimas tanases em várias fontes de polifenóis aumentando o poder antioxidante de bebidas largamente consumidas (Macedo *et al.*, 2011).

Song e colaboradores demonstraram que existe uma relação entre a idade da folha (broto e as duas primeiras folhas) e o nível de sombreamento, a qual se manifesta pelas concentrações dos compostos L-teanína, cafeína, (-)-galato de epigallocatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina e (-)-galato de epicatequina. Verificou-se que as concentrações de L-teanína e cafeína diminuem à medida que aumenta a idade das folhas, verificando-se exactamente o contrário para as catequinas analisadas (Song *et al.*, 2012).

A clorofila formada durante o desenvolvimento da folha jovem participa também na regulação das proporções individuais de catequinas no chá, o que sugere que o ambiente, especialmente as condições climáticas, têm um efeito significativo na biossíntese das catequinas (Wei *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2012).

Foi verificado por Kim e a sua equipa (Kim *et al.*, 2011) que os fenólicos totais e a capacidade antioxidante do chá verde são significativamente maiores que nos chás fermentados. Tal observação deve-se à diminuição dos flavonóides e outros fenólicos simples que ocorre ao longo do processo fermentação oxidativa. Esta diminuição é o resultado de processos de degradação e de polimerização que originam as teoflavinas poliméricas e as teorrubiginas (Kim *et al.*, 2011).

O rendimento de extracção de catequinas depende da temperatura e do tempo de extracção (Baptista *et al.*, 1999; Komes *et al.*, 2010). Assim, a determinação da capacidade antioxidante de alimentos, nomeadamente do chá, deve ter em conta as concentrações globais e as composições dos diversos compostos antioxidantes, uma vez que a capacidade antioxidante total é devido às diversas actividades combinadas de antioxidantes, incluindo compostos fenólicos. Diferentes métodos de determinação da capacidade antioxidante podem dar resultados muito diferentes. (Tabart *et al.*, 2009). Por outro lado outros componentes além dos fenólicos podem contribuir para a actividade antioxidante de um alimento. No caso do chá, Xu e sua equipa (Xu *et al.*, 2012) mostraram que os polissacarídeos em bruto, obtidos a partir das flores da planta do chá (*Camelia sinensis*) são polímeros naturais como elevada actividade antioxidante.

3.1.2 – Perfil de componentes fenólicos

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal e são considerados antioxidantes eficazes. Os compostos mais relevantes nos regimes alimentares são os derivados do ácido cinâmico e os flavonóides (Liebert *et al.*, 1999).

Os polifenóis das plantas são uma grande família de compostos com diferentes estruturas químicas possuindo consequentemente propriedades variáveis.

Estes compostos podem ser divididos de acordo com as classes apresentadas na tabela 3.2.

Tabela 3. 2 – Classe dos compostos fenólicos em plantas (Angelo & Jorge, 2007)

| Classe | Estrutura |
|---|--|
| Fenólicos simples, benzoquinonas | C ₆ |
| Ácidos hidroxibenzóicos | C ₆ -C ₁ |
| Acetofenol, ácidos fenilacéticos | C ₆ -C ₂ |
| Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides | C ₆ -C ₃ |
| Nafitoquinonas | C ₆ -C ₄ |
| Xantonas | C ₆ -C ₁ -C ₆ |
| Estilbenos, antoquinonas | C ₆ -C ₂ -C ₆ |
| Flavonóides, isoflavonóides | C ₆ -C ₃ -C ₆ |
| Lignanas, neolignanas | (C ₆ -C ₃) ₂ |
| Biflavonóides | (C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂ |
| Ligninas | (C ₆ -C ₃) _n |
| Taninos condensados | (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n |

Os ácidos fenólicos compreendem dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 3.1). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico, que têm a estrutura comum, C₆-C₁; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), sendo os mais comuns. os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico.

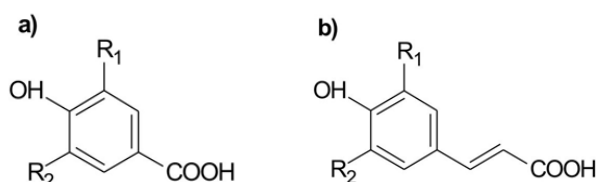


Figura 3. 1 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

Os flavonoides são componentes de baixo peso molecular, com estrutura base C₆-C₃-C₆ (dois anéis fenil – A e B - ligados através de um anel pirano (-C) (figura 3.2).

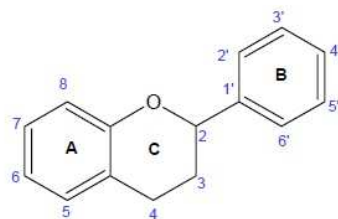


Figura 3. 2 – Estrutura base dos flavonoides (Ghedira, 2005)

Dentre os aproximados 4000 flavonóides já descritos em vários estudos, as maiores classes são os flavonóis, as catequinas ou flavanois, as flavonas, as antocianidinas, as flavanonas e as isoflavonas (figura 3.3). Nestas classes há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas. Além disso, os flavonóides formam complexos com açúcar, lipídeos, aminas e ácidos carboxílicos (Cerqueira *et al.*, 2007; Ghedira, 2005).

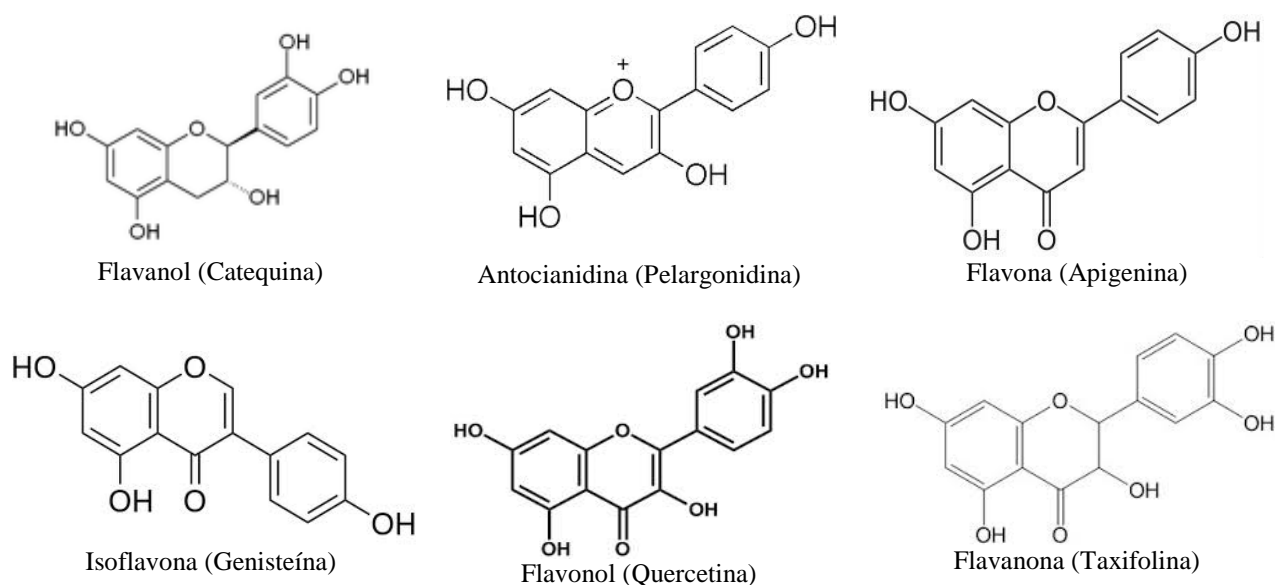


Figura 3. 3 – Estrutura das principais classes de flavonoides (Cerqueira *et al.*, 2007; Ghedira, 2005)

Assim, estruturalmente, os flavonoides são compostos aromáticos com 15 átomos de carbono, que sofrem facilmente interconversão entre formas isoméricas (figura 3.4).

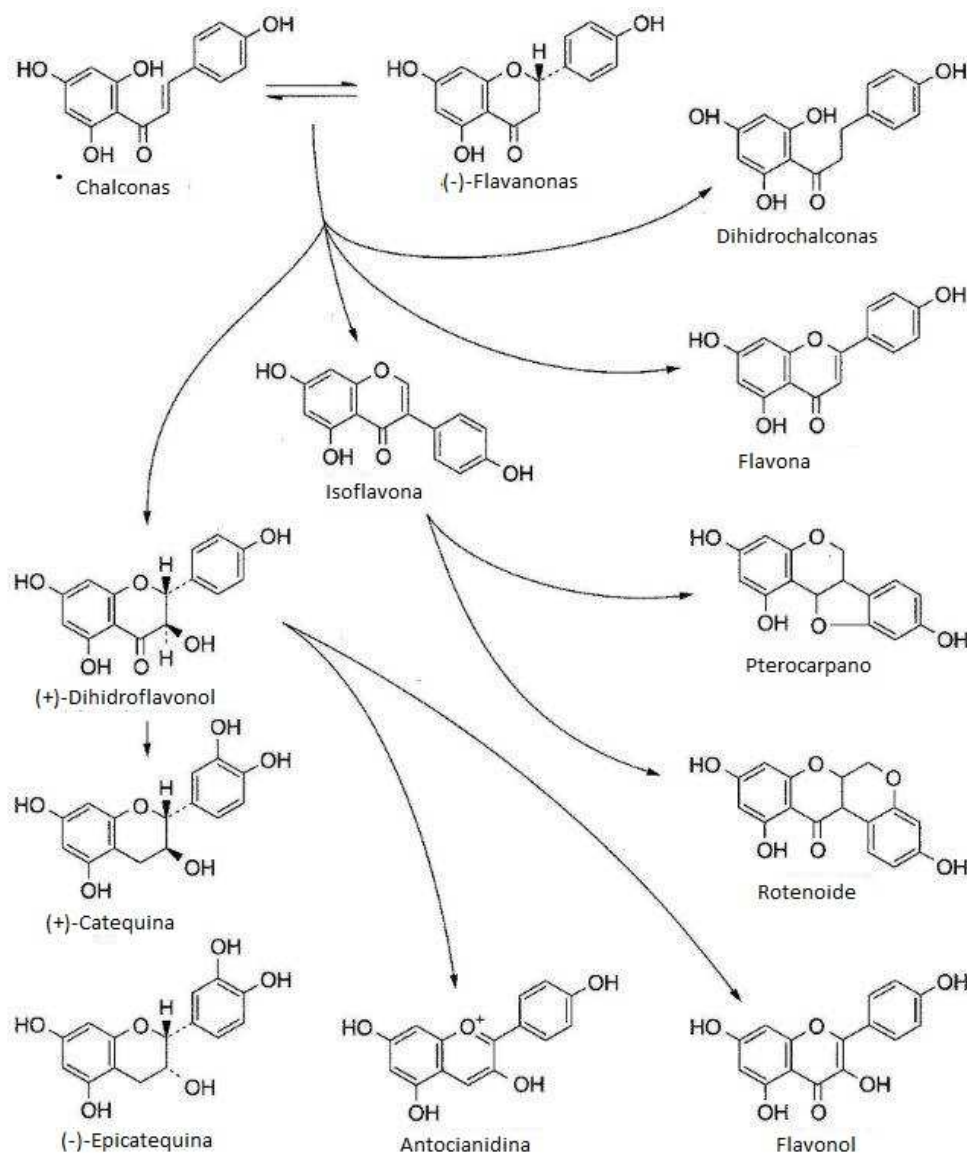


Figura 3. 4 - Interconversão dos principais grupos de flavonoides (Adaptado de Rice-Evans *et al.*, 1997).

Os flavonoides estão amplamente distribuídos entre o reino vegetal, sendo encontrados em vegetais, frutas, nozes, sementes, caule, flores, chá, vinho, etc. Algumas das fontes alimentares dos principais grupos de flavonoides são apresentadas na tabela seguinte (Tabela 3.3).

Tabela 3. 3 – Ocorrência de flavonoides em alimentos (Sandhar *et al.*, 2011; Ioannou & Ghoul, 2012; Kumar & Pandey, 2013; Volp *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2007)

| Classes de flavonoides | Fonte alimentar |
|------------------------|---|
| Flavonol | Cebola, couve, brócolos maçãs, cerejas, frutas, chá, vinho tinto, framboesas, chá preto engarrafado, chocolate preto, bagas |
| Flavonas | Salsa, tomilho, azeite, azeitonas, alcachofra, Cascas de frutas, vinho tinto, trigo mourisco, pimenta vermelha, tomate, alface, alho, vegetais de folhas verdes |
| Flavononas | Citrinos, vinho tinto, amêndoas, uvas, cascas de citrinos |
| Catequinas (Flavanois) | Maça, chá, vinho tinto, pistachio, ameixas, morangos, uvas pretas |
| Antocianidinas | Cerejas, uvas vermelhas, feijão preto comum, vinho tinto ou branco, framboesa vermelha, morangos, chá, peles de fruta com pigmentos escuros |
| Isoflavonas | Soja, legumes, feijão, vegetais |

Como foi referido anteriormente, vários estudos atribuem aos flavonóides uma vasta gama de actividades biológicas.

As isoflavonas são conhecidas pela sua actividade estrogénica (especialmente sobre os sintomas da menopausa e da osteoporose), antifúngica, bactericida, antimutagénica e antitumoral, especialmente em cânceros de mama e de próstata (Aguilar, 2002).

As antocianidinas podem ser associadas com propriedades aromatizantes que melhoram o paladar dos alimentos levando a hábitos alimentares saudáveis. São ainda associadas a propriedades anticancerígenas, antioxidante, antiviral e anti-inflamatórios. Além disso, as antocianinas são antimutagénicas e quimiopreventivas do cancro e têm um efeito positivo sobre a diabetes de tipo 2 e doença de Alzheimer (Borges *et al.*, 2013).

As flavanonas estão relacionadas com a diminuição do risco de cancro da boca e faringe (Rossi *et al.*, 2007).

As antocianinas são responsáveis pelas cores brilhantes de várias frutas, flores e produtos hortícolas (Ge & Ma, 2013). Estes compostos apresentam grandes benefícios para a saúde devido às suas actividades biológicas, que incluem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, nomeadamente através da inibição da oxidação das LDL e ainda grande potencial em reduzir o risco de desenvolvimento da aterosclerose, da diabetes e de doenças oncológicas, apresentando também efeitos positivos na acuidade visual e no comportamento cognitivo (Marques *et al.*, 2011; Ortíz *et al.*, 2011).

Os flavonóis estão relacionados com a diminuição do risco de cancro da boca e faringe (Rossi *et al.*, 2007). Foram ainda inversamente associados com o risco de várias neoplasias, principalmente do aparelho digestivo, incluindo o estômago e colo-rectal, da laringe e rim, do pulmão, e do sistema urinário, incluindo a próstata (Rossi *et al.*, 2007). O potencial anticancerígeno de flavonóis naturais é principalmente devido à capacidade destes compostos para interagirem com os vários alvos moleculares importantes para a progressão da doença e a resposta à quimioterapia (Dias *et al.*, 2013).

Os flavonóis, em particular, a quercetina e o campferol exibiram em vários estudos efeitos antidepressivos e/ou ansiolíticos (Vissiennon *et al.*, 2012).

Os flavanóis melhoram da função arterial, estimulam a diminuição da pressão sanguínea e melhoram a sensibilidade à insulina (Ottaviani *et al.*, 2011)

3.1.2.1 – Efeito da temperatura sobre os compostos fenólicos

A estabilidade dos compostos fenólicos durante o processamento dos alimentos que os contêm é afectada por reacções químicas e enzimáticas, sendo a degradação térmica apontada como a maior fonte da redução do teor de polifenóis. Na decomposição térmica, os fenóis podem reagir com outros componentes das folhas de chá (planta) e impedir sua extracção. (Moure *et al.*, 2001).

Um estudo realizado por Pérez-Conesa e sua equipa (2009) sobre as alterações dos compostos bioactivos e a capacidade antioxidante de puré de tomate mostrou que o aumento da temperatura de pasteurização levou a uma diminuição do ácido ascórbico, compostos fenólicos totais e folatos..

Outro estudo tendo como objeto o sumo de maçã (Zepka & Mercadante, 2009), mostrou que, como consequência do aquecimento, desaparecem compostos aparecendo outros em seu lugar, no entanto, as quantidades de carotenóides totais perdidos não foram compensados por aqueles que foram formados. Este mesmo efeito foi mostrado por Dhuique-Mayer e colaboradores (2007) estudando citrinos. Mostraram que a degradação da vitamina C, de dois carotenóides (α -caroteno e β -criptoxantina) e da hesperidina, ocorre em função da temperatura. Dutra e colaboradores (2012) verificaram que o teor de

caratenóides totais, num sumo de tangerina, decresceu de forma significativa em quase todos os tratamentos térmicos aplicados, quando comparado com o valor encontrado para o sumo natural. Este efeito foi também verificado, neste estudo, para os teores de ácido ascórbico e para a capacidade antioxidante.

Foi ainda estudado o efeito do tratamento térmico em compostos bioactivos da polpa de morango silvestre, nomeadamente as antocianinas monoméricas totais e os fenólicos totais, numa gama de temperatura entre os 60°C e os 90°C. Aqui foi verificado que as antocianinas monoméricas totais e os fenóis totais foram degradados com o aumento da temperatura e do tempo. Apesar das perdas de antocianinas monoméricas e compostos fenólicos totais em todas as amostras, verificou-se um aumento da actividade antioxidante durante o armazenamento. A causa deste aumento pode dever-se à formação de compostos poliméricos que não são especificamente detetados nestes testes mas contribuem para a actividade antioxidante da polpa (Özsen & Erge, 2013).

No sumo de uvas, é também a temperatura o factor mais importante que determina a velocidade de degradação. Sumos foram processados a diferentes temperaturas, entre os 50°C e os 80°C. A degradação dos componentes fenólicos assim como a diminuição da actividade antioxidante foi evidente a temperaturas de processamento superiores a 60°C (Martino *et al.*, 2013).

As catequinas do chá podem degradar-se por reacções de oxidação, polimerização e epimerização. (Ananingsih *et al.*, 2013). A epimerização, conversão de catequinas de chá nos seus isómeros, pode ocorrer a uma temperatura elevada. Foi relatado por Wang e colaboradores (2008b) que a concentração de epicatequinas diminuiu, enquanto a concentração dos seus isómeros aumentou à medida que a temperatura aumentou. Assim, com o aumento da temperatura existe uma diminuição das epicatequinas e um aumento de concentração dos seus isómeros (não-epicatequinas) (figura 3.5). Esta epimerização pode ocorrer com altas temperaturas ou em condições anaeróbicas (Sang *et al.*, 2011).

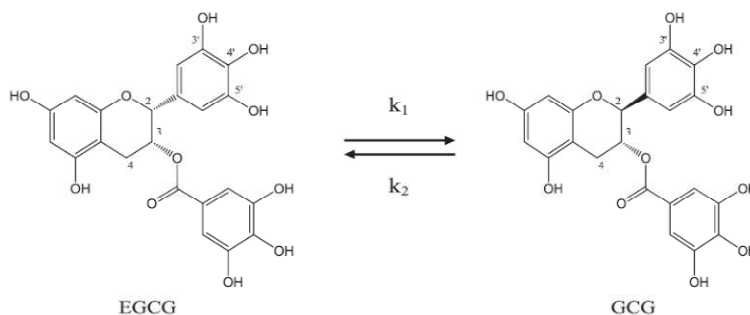


Figura 3. 5 – Epimerização reversível da estrutura de epicatequina (EGCG) numa estrutura de catequina (GCG) (Ananingsih *et al.*, 2013)

A degradação e a epimerização de catequinas do chá podem ocorrer simultaneamente em processos térmicos (Ananingsih *et al.*, 2013).

Chen e equipa relataram que cerca de 20% das catequinas do chá se perdeu quando as folhas de chá foram aquecidas em água durante 7 horas a 98°C. Estes autores verificaram também que apenas 76 % das catequinas do chá, permaneceram na infusão após tratamento em autoclave durante 20 min a 120°C (Chen *et al.*, 2001).

3.1.3 - Compostos bioactivos do chá

A composição química da folha de chá varia em função de factores genéticos, ambientais e de práticas de cultivo. As plantas de chá cultivadas apresentam uma grande heterogeneidade genética que se vai refletir no chá produzido. Os factores ambientais afectam a crescimento e desenvolvimento da planta: pequenas alterações climáticas ou geográficas são suficientes para causar diferenças na composição da folha, consequentemente, na qualidade do chá. As práticas culturais como a poda, o padrão e intervalo de colheita e o sombreamento afectam as condições de desenvolvimento do rebento e vão reflectir-se também na sua composição química (Pacheco, 2005). Assim, a composição das folhas de chá varia com o clima, a estação, as práticas de horticultura, a variedade da planta e a idade da folha.

Dependendo do processo de produção utilizado, as suas folhas são a base para a produção de três principais tipos principais de chá: chá verde, oolong e preto, sendo que a diferença entre estes depende do grau de inactivação das enzimas foliares durante o processamento.

O chá verde é produzido a partir da folha fresca, a qual é aquecida mais rapidamente após a colheita para inactivação da enzima oxidase dos polifenóis, e não é sujeita a tratamento posterior. O chá oolong ou parcialmente oxidado é obtido por oxidação das folhas durante duas a quatro horas, sendo depois aquecidas para que o processo oxidativo seja interrompido. O chá preto é envelhecido pela oxidação aeróbica das catequinas, catalizada enzimaticamente (Liebert *et al.*, 1999; Senger *et al.*, 2010). Consequentemente, chás verde e preto diferem notavelmente na composição sabor, aparência e química.

O chá contém óleos voláteis (Ferrara *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011), vitaminas, minerais e purinas (Ferrara *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008a), polifenóis (Ferrara *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011; Wie *et al.*, 2011; El-Shahawi *et al.*, 2012; Wie *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012), aminoácidos (Wang *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2012), ácido clorogénico (Marques *et al.*, 2009) e metilxantinas (Komes *et al.*, 2010).

A composição média da bebida chá entre a que é obtida a partir de chá verde e aquela que é obtida para o chá preto é apresentada na tabela seguinte:

Tabela 3. 4 – Composição média da bebida chá (% peso seco/sólidos totais) (Harbowy & Balentine, 1997)

| | Chá verde | Chá preto |
|--------------------------|------------------|------------------|
| Catequinas | 30 | 9 |
| Teoflavinas | -- | 4 |
| Polifenóis simples | 2 | 3 |
| Flavonóis | 2 | 1 |
| Outros polifenóis | 6 | 23 |
| Teanina | 3 | 3 |
| Aminoácidos | 3 | 3 |
| Peptídeos/proteínas | 6 | 6 |
| Ácidos orgânicos | 2 | 2 |
| Açúcares | 7 | 7 |
| Outros carboidratos | 4 | 4 |
| Lípidos | 3 | 3 |
| Cafeína | 3 | 3 |
| Outras metilxantinas | <1 | <1 |
| Potássio | 5 | 5 |
| Outros minerais / cinzas | 5 | 5 |
| Aroma | Vestígios | Vestígios |

Vários estudos têm demonstrado que as variações no teor de polifenóis do chá são resultado de um grande número de factores como a variedade (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2011), idade das folhas (Song *et al.*, 2012), idade da cultura (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2011), o processamento industrial (fermentação e esmagamento) (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; Carloni *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2012), armazenamento (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2011) e factores climáticos (Wei *et al.*, 2011). O teor de polifenóis é ainda dependente da temperatura da água e do tempo de infusão (Baptista *et al.*, 1998; Komes *et al.*, 2010; Samaniego-Sánchez *et al.*, 2011) bem como do tempo de armazenamento das infusões (Komes *et al.*, 2010).

A Tabela 3.5 mostra os componentes principais presentes em bebidas típicas de chá verde e preto. A composição do chá oolong, em geral, fica entre a composição do chá verde e a composição do chá preto.

Tabela 3. 5 – Principais constituintes do chá (% peso seco) (Liebert *et al.*, 1999; Dufresne *et al.*, 2001; Luczaj & Skrzydlewska, 2005; Shukla, 2007).

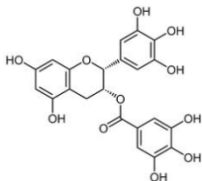
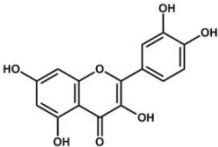
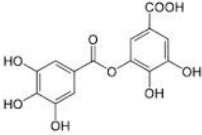
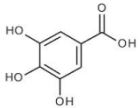
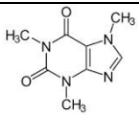
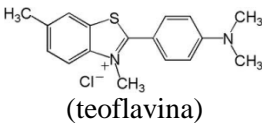
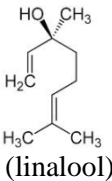
| Constituintes | Estruturas | Chá verde | Chá preto |
|--|--|--|---|
| Catequinas - galato de epigallocatequina - galato de epicatequina - galato de galocatequina - epicatequina - epigallocatequina - catequina |  (galato de epigallocatequina) | 30-42 10-15 2-10 1-5 3-10 | 3-10 4-5 3-4 1-2 1-2 |
| Flavonóis - quercetina - quenferol (flavanol, 3,4',5,7-tetraidroxiflavona) - rutina (vitamina P) |  (quercetina) | 5-10 | 6-8 |
| Outros flavonoides | | 2-4 | --- |
| Teogalina (ácido 5-galoilquínico) |  | 2-3 | --- |
| Ácidos orgânicos - ácido gálico - ácido quinico - ácido cafeico |  (ácido gálico) | 3-5 0.5 2.0 | 10-12 |
| Aminoácidos - Tianina | | 4-6 | 13-15 |
| Metilxantinas (alcaloides) - Cafeína - teobromina - teofilina |  (cafeína) | 7-9 3-5 0.1 0.02 | 8-11 |

Tabela 3.5 (Continuação)

| Constituintes | Estruturas | Chá verde | Chá preto |
|---|---|-----------|-----------|
| Teoflavinas - teoflavina-3-galato - teoflavina-3'-galato - teoflavina-3,3'-digalato |  (teoflavina) | --- | 3-6 |
| Teorubiginas | | --- | 10-30 |
| Proantocianidinas | | --- | --- |
| Voláteis - linalool - δ -cardineno - geraniol - α -terpineol - cis-jasmoma - índole - β -ionono - 1-octanal - índole-3-carbinol - β -cariofileno |  (linalool) | | < 0,1 |

Catequinas e os seus dímeros (teaflavinas) e polímeros (tearubiginas) foram identificados como os principais componentes do chá (Sang *et al.*, 2011).

As catequinas do chá incluem quatro compostos principais (Figura 3.6): a epicatequina (EC), o galato de epicatequina (ECG), a epigalocatequina (EGC), o galato de epigalocatequina (EGCG), e quatro compostos secundários, a catequina (C), o galato de catequina (CG), a galocatequina (GC), e o galato de galocatequina (GCG). A EGCG é a catequina predominante nas folhas de chá verde, correspondendo a 48-55% do total de polifenóis (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006).



Figura 3. 6 – Estrutura química das catequinas primárias. (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006)

A cromatografia líquida e electroforese capilar são as técnicas mais citadas para a separação, identificação e quantificação de catequinas (Dalluge & Nelson, 2000).

No entanto, muitos métodos têm sido relatados para a análise dos conteúdos de catequinas no chá verde (El-Shahawi *et al.*, 2012): a eletroforese capilar (CE), cromatografia em camada fina, espectrometria de infravermelho próximo, espectrometria de infravermelho próximo com transformada de Fourier, cromatografia capilar por contra-corrente, e técnicas de calibração multivariada. A cromatografia líquida com detecção por ultravioleta, electroquímica, ou fluorescência a espectrometria de massa, e a quimioluminescência também são utilizadas nos casos em que é necessária a detecção mais sensível ou selectiva, (Dalluge & Nelson, 2000).

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) foi utilizada para analisar constituintes do chá preto e verde na década de 1970 e mostrou boas separações dos compostos fenólicos do chá. No entanto, a reprodutibilidade quantitativa da análise de HPLC era ainda muito fraca, até o final de 1980, altura em que os melhoramentos na qualidade das colunas e dos detectores e a introdução do detector de fotodiodos (PDA) aumentou significativamente a sensibilidade e reprodutibilidade dos sistemas de HPLC contribuindo para a separação efectiva e a identificação dos pigmentos de chá preto a partir da oxidação química de polifenóis de chá verde, epigallocatequina galato (EGCG) e epicatequina galato (ECG) (Yao *et al.*, 2004).

O HPLC foi utilizado para determinação simultânea de conteúdos de catequinas e cafeína no chá verde. Este método mostrou ser rápido, reprodutível, preciso e ideal para análises de rotina. Mostrou ainda que existem diferenças significativas no conteúdo de cafeína e de catequinas. As suas concentrações variam da seguinte forma: a concentração de galato de epigallocatequina é maior que a concentração de epigallocatequina, por sua vez é maior que a concentração de galato de epicatequina, a concentração de epicatequina, concentração de catequina e, por fim que a concentração da cafeína (El-Shahawi *et al.*, 2012).

Estudos realizados por Wang e sua equipa (Wang *et al.*, 2010) mostraram que a tiamina foi o aminoácido mais abundante no chá e a histidina o segundo mais abundante. Esses estudos mostraram ainda que, o chá verde contém quantidades mais elevadas de aminoácidos livres que os chás fermentados.

Em geral, os compostos voláteis aumentam com a fermentação das folhas de chá (Kim *et al.*, 2011). Altos teores de ácidos clorogénicos foram identificados na *Camellia sinenses* havendo uma extracção satisfatória na preparação de infusões (Marques *et al.*, 2009).

Associando as metodologias HPLC e GC de forma sequencial é possível a determinação nos chás de componentes não voláteis (catequinas) e voláteis (aromas) (Baptista *et al.*, 1999).

Estudos demonstram que existe uma grande adequação de HPLC-RF combinada com a absorção UV e espectrometria de massa para a identificação correcta e quantificação dos compostos relevantes em folhas de chá. O LC-MS é especialmente útil para a identificação de estruturas de compostos traço, quando não estão disponíveis compostos padrão (Wu *et al.*, 2012).

Um estudo comparativo da determinação de sete catequinas e ácido gálico em chá utilizando HPLC e HPCE (electroforese capilar de alta eficiência), demonstrou que a HPCE apresenta maior sensibilidade, resolução e eficiência que o HPLC. Os limites de detecção deste método são cerca de 20 a 100 vezes menores que as de HPLC, o que se torna extremamente vantajoso em sistemas reais. Verifica-se ainda que os tempos de análise são menores na HPCE (cerca de 12 minutos) que em HPLC (cerca de 40 minutos) (Bonoli *et al.*, 2003)

He e colaboradores estudaram a determinação de catequinas por HPLC utilizando uma coluna Hypersil ODS C₁₈ e um gradiente de eluição de metanol-acetonitrilo 0,2 % e efectuando a derivatização das catequinas com o reagente de vanilina - HCl. A quantificação do complexo catequina:vanilina foi efectuada ao comprimento de onda de 505 nm. O método de HPLC mostrou boa resolução de catequinas individuais, e verificou-se ser mais preciso, para a quantificação do total de catequinas (somados catequinas individuais). (He *et al.*, 2009).

Entre os diferentes métodos de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica mais utilizada na separação dos compostos fenólicos de chá. O HPLC com detecção por vector de diodos (DAD) é frequentemente usado, o que permite a detecção com alta sensibilidade de compostos

poliinsaturados mas, não discrimina os diferentes compostos possuindo grupos cromóforos semelhantes (Wang *et al.*, 2008a).

A tabela abaixo (tabela 3.6) apresenta o tipo de colunas, eluentes e comprimentos de onda e/ou gamas utilizadas nos diferentes artigos para a determinação de componentes do chá por HPLC.

Tabela 3. 6 - Tipos de colunas, eluentes e comprimentos de onda e/ou gamas de comprimentos de onda indicados nos diferentes artigos para a determinação dos componentes do chá por HPLC.

| Coluna | Eluentes utilizados | λ (nm) | Artigo(s) |
|-------------------------------|---|----------------|---------------------------------|
| C18 | acetonitrilo/acetato de etilo/ácido ortofosfórico/água | 280 | Baptista <i>et al.</i> , 1998 |
| C18 | acetonitrilo/acetato de etilo/H ₂ SO ₄ | 280 | Chen <i>et al.</i> , 2001 |
| C18 | água/metanol/ácido fórmico/acetonitrilo | 270 | Bonoli <i>et al.</i> , 2003 |
| C18 | acetonitrilo/ácido fórmico | 275 | Wang <i>et al.</i> , 2008a |
| C18 | acetonitrilo/água/metanol | 280 | He <i>et al.</i> , 2009 |
| C18 | ácido fórmico/água/metanol | 280 | Komes <i>et al.</i> , 2010 |
| C18 | água/metanol | 280; 360 | Kim <i>et al.</i> , 2011 |
| C18 | acetonitrilo/ácido trifluoracético | 205 | El-Shahawi <i>et al.</i> , 2012 |
| C18 | acetonitrilo/água | 200 | Song <i>et al.</i> , 2012 |
| C18 | água/acetonitrilo/metanol/acetato de etilo/ácido acético | 254-280 | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| C18 | água/acetonitrilo/metanol/acetato de etilo/ácido acético glacial | 280 | Saito <i>et al.</i> , 2006 |
| C18 | acetonitrilo/água/ácido ortofosfórico | 280 | Sharma <i>et al.</i> , 2005 |
| C18 | água/metanol | 260 | Souza, 2008 |
| C18 | água/ácido acético/metanol | 280 | Carlioni <i>et al.</i> , 2013 |
| C18 | água/ácido ortofosfórico/metanol | 280 | Wang <i>et al.</i> , 2003 |
| C18 | água/ácido acético/acetonitrilo | | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| C18 | água/ácido acético/acetonitrilo/EDTA | 280 | Chen <i>et al.</i> , 2008 |
| C18 | metanol/água/ácido ortofosfórico/acetonitrilo | 280 | Wang <i>et al.</i> , 2000 |
| C18 | acetonitrilo/ácido acético/água | 210 | Serpen <i>et al.</i> , 2012 |
| C18 | água/acetonitrilo/ácido trifluoracético e água/acetonitrilo/metanol | 280 | Dalluge <i>et al.</i> , 1998 |
| C18 | ácido fosfórico/acetonitrilo/metanol | 210 | Mizukami <i>et al.</i> , 2007 |
| Coluna HG | água/acetonitrilo/ácido fosfórico | 210 | Goto <i>et al.</i> , 1996 |
| C18 | água/ácido acético/metanol | 200-300 | Zuo <i>et al.</i> , 2002 |
| C18 | água/acetonitrilo/ácido fosfórico/metanol | 280 | Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| C12 | acetonitrilo/água/ácido fórmico | 210-230 | Bahorun <i>et al.</i> , 2012 |
| C12 | acetonitrilo/água/ácido fórmico | 280; 365 | Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Para cafeína e catequinas: C6 | De acordo com procedimento ISO 14502-2-2005E | 200-700 | Kerio <i>et al.</i> , 2013 |
| Para antocianinas: C18 | De acordo com procedimento ISO 14502-2-2005E | | Kerio <i>et al.</i> , 2013 |
| C18 | acetonitrilo/água/ácido fórmico | 278 | Kerio <i>et al.</i> , 2012 |

Nesses trabalhos são identificados diferentes compostos presentes nas infusões. A tabela seguinte (tabela 3.7) dá uma listagem dos constituintes do chá identificados nos vários estudos, bem como das respectivas estruturas químicas e pesos moleculares. Estas estruturas foram identificadas utilizando comprimentos de onda entre os 200 nm e os 360 nm.

Tabela 3. 7 - Compostos, formulas e pesos moleculares e comprimentos de onda e/ou gamas de comprimentos de onda identificados no chá por HPLC.

| Composto referido | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) | λ (nm) | Referências |
|-------------------------------|---------------------|------------------------|--|---|
| Catecol | $C_6H_6O_2$ | 110,10 | 210 | Mizukami <i>et al.</i> , 2007 |
| Ácido p-anisico | $C_8H_8O_3$ | 152,15 | 280 | Zuo <i>et al.</i> , 2002 |
| Ácido 3,5-dihidroxibenzóico | $C_7H_6O_4$ | 154,12 | 280 | Zuo <i>et al.</i> , 2002 |
| Ácido p-cumárico | $C_9H_8O_3$ | 164,16 | 254-280 | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Ácido gálico | $C_7H_6O_5$ | 170,12 | 280, 254-280, 210 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; He <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2011; Ramalho <i>et al.</i> , 2013; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Carloni <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2000; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Zuo <i>et al.</i> , 2002; Bahorun <i>et al.</i> , 2012; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Ácido ascórbico | $C_6H_8O_6$ | 176,12 | 210 | Mizukami <i>et al.</i> , 2007 |
| Teofilina | $C_7H_8N_4O_2$ | 180,16 | 280 | Sharma <i>et al.</i> , 2005 |
| Teobromina | $C_7H_8N_4O_2$ | 180,16 | 210; 280; 275 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008a; Kim <i>et al.</i> , 2011; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2003; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Ácido quínico | $C_7H_{12}O_6$ | 192,17 | 280 | (Dou <i>et al.</i> , 2007) |
| Cafeína | $C_8H_{10}N_4O_2$ | 194,19 | 280; 275; 200; 210; 200-300, 210-230; 205 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; Wang <i>et al.</i> , 2008a; He <i>et al.</i> , 2009; Kim <i>et al.</i> , 2011; Song <i>et al.</i> , 2012; Ramalho <i>et al.</i> , 2013; Saito <i>et al.</i> , 2006; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2000; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Dalluge <i>et al.</i> , 1998; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Nishitani & Sagesaka, 2004; Bahorun <i>et al.</i> , 2012; El-Shahawi <i>et al.</i> , 2012; Zuo <i>et al.</i> , 2002; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Propil-galato | $C_{10}H_{12}O_5$ | 212,20 | 254-280 | Ramalho <i>et al.</i> , 2013 |
| Quinona | $2^*C_6H_4O_2$ | 216,19 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico | $C_{12}H_{14}O_5$ | 238,24 | 280 | Zuo <i>et al.</i> , 2002 |
| Tiamina | $C_{12}H_{17}N_4OS$ | 265,36 | 200 | Song <i>et al.</i> , 2012 |
| Campferol | $C_{15}H_{10}O_6$ | 286,24 | 260 | Moraes de Souza, 2008 |
| Catequina | $C_{15}H_{14}O_6$ | 290,27 | 280, 270, 275, 254-280, 210, 200-300, 210-230; 205 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; Chen <i>et al.</i> , 2001; Bonoli <i>et al.</i> , 2003; Ramalho <i>et al.</i> , 2013; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2003; Fraser <i>et al.</i> , 2012; Chen <i>et al.</i> , 2008; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Nishitani & Sagesaka, 2004; Bahorun <i>et al.</i> , 2012; Carloni <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2008a) (Saito <i>et al.</i> , 2006; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Dalluge <i>et al.</i> , 1998; El-Shahawi <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2000; Komes <i>et al.</i> , 2010; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |

Tabela 3.7 (Continuação)

| Composto referido | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) | λ (nm) | Referências |
|---------------------------|----------------------|------------------------|--|---|
| Epicatequina | $C_{15}H_{14}O_6$ | 290,27 | 280, 205,200, 210, 200-300, 270, 275 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; Chen <i>et al.</i> , 2001; Kim <i>et al.</i> , 2011; El-Shahawi <i>et al.</i> , 2012; Song <i>et al.</i> , 2012; Saito <i>et al.</i> , 2006; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Fraser <i>et al.</i> , 2012; Chen <i>et al.</i> , 2008; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Dalluge <i>et al.</i> , 1998; Goto <i>et al.</i> , 1996; Bahorun <i>et al.</i> , 2012; Bonoli <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2008a; He <i>et al.</i> , 2009; Komes <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2000; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Zuo <i>et al.</i> , 2002; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Quercetina | $C_{15}H_{10}O_7$ | 302,24 | 260 | Moraes de Souza, 2008 |
| Epigallocatequina | $C_{15}H_{14}O_7$ | 306,27 | 280, 270, 275, 205, 200, 210, 200-300, 210-230 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; Chen <i>et al.</i> , 2001; Bonoli <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2008a; He <i>et al.</i> , 2009; Komes <i>et al.</i> , 2010; Kim <i>et al.</i> , 2011; El-Shahawi <i>et al.</i> , 2012; Song <i>et al.</i> , 2012; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Carloni <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2003; Dou <i>et al.</i> , 2007; Chen <i>et al.</i> , 2008; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Dalluge <i>et al.</i> , 1998; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Zuo <i>et al.</i> , 2002; Nishitani & Sagesaka, 2004; Bahorun <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2000; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Galocatequina | $C_{15}H_{14}O_7$ | 306,27 | 280, 270, 275, 210, 200-300, 210-230 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; Bonoli <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2008a; Komes <i>et al.</i> , 2010; Kim <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2013; Fraser <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2000; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Nishitani & Sagesaka, 2004; Bahorun <i>et al.</i> , 2012; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Miricetina | $C_{15}H_{10}O_8$ | 318,24 | 260 | Moraes de Souza, 2008; Zuo <i>et al.</i> , 2002 |
| Ácido 3-p-cumaroilquinico | $C_{16}H_{18}O_8$ | 338,31 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Del Rio <i>et al.</i> , 2004) |
| Ácido 4-p-cumaroilquinico | $C_{16}H_{18}O_8$ | 338,31 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Ácido 5-p-cumaroilquinico | $C_{16}H_{18}O_8$ | 338,31 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Ácido p-cumaroilquinico | $C_{16}H_{18}O_8$ | 338,31 | 280; 210-230 | Baptista <i>et al.</i> , 1998; Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| Ácido 4-o-cumaroilquinico | $C_{16}H_{18}O_8$ | 338,31 | 210-230 | Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| coniferina | $C_{16}H_{22}O_8$ | 342,34 | 210-230 | Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| Ácido 5-galoilquinico | $C_{14}H_{16}O_{10}$ | 344,30 | 275; 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008a; Kim <i>et al.</i> , 2011; Bahorun <i>et al.</i> , 2012 |
| Ácido clorogénico | $C_{16}H_{18}O_9$ | 354,31 | 210-230; 254-280 | Nishitani & Sagesaka, 2004; Ramalho et al., 2013 |
| Ácido 5-cafeoilquinico | $C_{16}H_{18}O_9$ | 354,31 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Aperginina glicosilada | $C_{21}H_{20}O_{10}$ | 432,38 | 360 | Kim <i>et al.</i> , 2011 |

Tabela 3.7 (continuação)

| Composto referido nos artigos | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) | λ (nm) | Referências |
|--|----------------------|------------------------|--|---|
| epicatequina-3-O-galato | $C_{22}H_{18}O_{10}$ | 442,37 | 280, 270, 275, 205, 200, 210, 200-300, 210-230 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; Chen <i>et al.</i> , 2001; Bonoli <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2008a; He <i>et al.</i> , 2009; Komes <i>et al.</i> , 2010; Kim <i>et al.</i> , 2011; El-Shahawi <i>et al.</i> , 2012; Song <i>et al.</i> , 2012; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Carloni <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2000; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Dalluge <i>et al.</i> , 1998; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Zuo <i>et al.</i> , 2002; Nishitani & Sagesaka, 2004; Del Rio <i>et al.</i> , 2004) |
| (-)-Catequina 3-O-galato | $C_{22}H_{18}O_{10}$ | 442,37 | 280, 210, 200 a 300, 210-230 | Wang <i>et al.</i> , 2013; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Zuo <i>et al.</i> , 2002; Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| Campferol-3-O-rutinosideo | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 448,38 | 280, 275 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Campferol-3-O-glucosideo | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 448,38 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Campferol glucosideo | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 448,38 | 360 | Kim <i>et al.</i> , 2011 |
| Campferol 3-rutinosideo | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 448,38 | 360 | Kim <i>et al.</i> , 2011; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Campferol 3'-rutinosideo | $C_{21}H_{20}O_{11}$ | 448,38 | 360 | Kim <i>et al.</i> , 2011 |
| Epicatequina-3-O-(4-O-metil) galato | $C_{23}H_{20}O_{10}$ | 456,40 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| (-)-Epicatequina-3-(3"-O-metil) galato | $C_{23}H_{20}O_{10}$ | 456,40 | 280 | Wang <i>et al.</i> , 2008a |
| Epicatequina-3-O-(3-O-metil) galato | $C_{23}H_{20}O_{10}$ | 456,40 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Epigallocatequina-3-O-galato | $C_{22}H_{18}O_{11}$ | 458,37 | 280, 270, 275, 205, 200, 210, 200-300, 210-230 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Baptista <i>et al.</i> , 1998; Chen <i>et al.</i> , 2001; Bonoli <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2008a; He <i>et al.</i> , 2009; Komes <i>et al.</i> , 2010; El-Shahawi <i>et al.</i> , 2012; Song <i>et al.</i> , 2012; Saito <i>et al.</i> , 2006; Sharma <i>et al.</i> , 2005; Carloni <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2003; Chen <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2000; Serpen <i>et al.</i> , 2012; Dalluge <i>et al.</i> , 1998; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Zuo <i>et al.</i> , 2002; Nishitani & Sagesaka, 2004; Bahorun <i>et al.</i> , 2012 |
| Galocatequina-3-O-galato | $C_{22}H_{18}O_{11}$ | 458,37 | 280, 270, 275, 210, 200-300, 210-230 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Chen <i>et al.</i> , 2001; Bonoli <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2008a; He <i>et al.</i> , 2009; Komes <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2000; Dalluge <i>et al.</i> , 1998; Mizukami <i>et al.</i> , 2007; Goto <i>et al.</i> , 1996; Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| Quercetina-3-O-galactosideo | $C_{21}H_{20}O_{12}$ | 464,38 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Epigallocatequina-3-O-(4-O-metil) galato | $C_{23}H_{20}O_{11}$ | 472,40 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| (-)-Epigallocatequina 3-O-(3"-O-metil)galato | $C_{23}H_{20}O_{11}$ | 472,40 | 275, 210-230 | Wang <i>et al.</i> , 2008a; Nishitani & Sagesaka, 2004 |

Tabela 3.7 (continuação)

| Composto referido nos artigos | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) | λ (nm) | Referências |
|--|----------------------|------------------------|------------------|---|
| Epigallocatequina-3-O-(3-O-metil) galato | $C_{23}H_{20}O_{11}$ | 472,40 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Epigallocatequina -3'-(3-metil) galato EGCg'3Me | $C_{23}H_{20}O_{11}$ | 472,40 | 210 | Mizukami <i>et al.</i> , 2007 |
| Miricitina-3-O-galactosídeo | $C_{21}H_{20}O_{13}$ | 480,38 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Miricitina 3-glicosídeo | $C_{21}H_{20}O_{13}$ | 480,38 | 360 | Kim <i>et al.</i> , 2011 |
| Miricitina-3-O-glucosídeo | $C_{21}H_{20}O_{13}$ | 480,38 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| 6-C-arabinosil-8-C-glucosil apigenina | $C_{26}H_{28}O_{14}$ | 564,49 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| 6-C-glucosil-8-C-arabinosil apigenina | $C_{26}H_{28}O_{14}$ | 564,49 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Teoflavina | $C_{29}H_{24}O_{12}$ | 564,49 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Del Rio <i>et al.</i> , 2004 |
| Ramnosilvitexina | $C_{27}H_{30}O_{14}$ | 578,52 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| 2"-O-ramnosilvitexina (Vitexina-2'-o-ramnosídeo) | $C_{27}H_{30}O_{14}$ | 578,52 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| 4"-O-glucosilvitexina | $C_{27}H_{30}O_{15}$ | 594,53 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Rutina | $C_{27}H_{30}O_{16}$ | 610,15 | 254-280; 360 | Ramalho <i>et al.</i> , 2013; Kim <i>et al.</i> , 2011 |
| (-)-Epigallocatequina-3,5-digalato | $C_{29}H_{22}O_{15}$ | 610,48 | 275, 210-230 | Wang <i>et al.</i> , 2008a; Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| Teasinensina C | $C_{30}H_{26}O_{14}$ | 610,52 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Prodelfinidina B-4 | $C_{30}H_{26}O_{14}$ | 610,52 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Estrictinina | $C_{27}H_{22}O_{18}$ | 634,45 | 280, 275; 210 | Dou <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008a; Mizukami <i>et al.</i> , 2007 |
| 1,4,6-tri-O-galoil- β -D-glucose | $C_{27}H_{24}O_{18}$ | 636,47 | 210-230 | Nishitani & Sagesaka, 2004 |
| Teoflavina-3-O-galato | $C_{36}H_{28}O_{16}$ | 716,60 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Teoflavina-3'-O-galato | $C_{36}H_{28}O_{16}$ | 716,60 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Campferol-3-O-galactosil-ramnosil-glucosídeo | $C_{33}H_{40}O_{20}$ | 756,66 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Prodelfinidina A-2 3'-O-galato | $C_{37}H_{28}O_{18}$ | 760,61 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Teasinensina B ou E | $C_{37}H_{30}O_{18}$ | 762,62 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Prodelfinidina B-2 (or 4) 3'-O-galato | $C_{37}H_{30}O_{18}$ | 762,62 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Quercetina 3-glucosil-ramnosil-galactosídeo | $C_{33}H_{40}O_{21}$ | 772,66 | 360 | Kim <i>et al.</i> , 2011 |
| Teoflavina-3, 3 - digalato | $C_{43}H_{32}O_{20}$ | 868,70 | 280 | Serpen <i>et al.</i> , 2012 |
| Epiafzelequina-3-O-galato-epicatequina-3-O-galato | $C_{44}H_{34}O_{20}$ | 882,73 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Procianidina B-2 (or 4) 3,3'-O-digalato | $C_{44}H_{34}O_{20}$ | 882,73 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 200 |
| Campferol-3-O-glucosil-ramnosil-(p-cumaroil)hexosídeo | $C_{42}H_{46}O_{22}$ | 902,80 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Teasinensina A ou D | $C_{44}H_{34}O_{22}$ | 914,73 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Quercetina-3-O-glucosil-ramnosil-(p-cumaroil)hexosídeo | $C_{42}H_{46}O_{23}$ | 918,80 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |

Tabela 3.7 (continuação)

| Composto referido nos artigos | Formula Molecular | Peso Molecular (g/mol) | λ (nm) | Referências |
|--|----------------------|------------------------|----------------|--------------------------|
| Dímero de epicatequina | $C_{30}H_{24}O_{12}$ | 576,50 | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Epicatequina-epigallocatequina 3-O-galato | | | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Quercetina-3-O-glucosil-ramnosil-glucosideo | | | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Campferol-3-O-glucosil-ramnosil-glucosideo | | | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Quercetina-3-O-glucosil-ramnosil-(p-cumaroil-hexosil)hexosideo | | | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |
| Campferol-3-O-glucosil-ramnosil-(p-cumaroil-hexosil)hexosideo | | | 280 | Dou <i>et al.</i> , 2007 |

Neste trabalho pretendemos estudar a composição e propriedades funcionais dos chás dos Açores, analisando as suas propriedades antioxidantes, o seu perfil de compostos fenólicos e procurando estabelecer correlações entre estes parâmetros.

Por outro lado, procurou-se avaliar de que forma estas propriedades variam de acordo com o tempo de infusão dos chás.

Pretendeu-se ainda comparar as propriedades funcionais dos chás dos Açores com outros chás verdes e pretos comerciais bem como com algumas tisanas.

Para atingir estes objectivos gerais definiram-se os seguintes objectivos específicos:

- Determinar fenólicos totais e as propriedades antioxidantes de infusões de 5, 15 e 30 minutos de chás verdes e de chás pretos;
- Comparar as propriedades bioactivas das infusões de 5 minutos anteriores com chás vermelhos e tisanas, preparadas da mesma forma;
- Comparar as propriedades bioactivas de infusões de 5 minutos de chá verde dos Açores (Folha Enrolada, Encosta da Bruma e Hysson) estudados em folha solta e em chá moído.
- Determinação do perfil de fenólico nas infusões de 15 minutos e nos extractos aquosos de chás verdes e de chás pretos;
- Comparar o perfil de compostos fenólicos identificados em infusões de chá verde, Encosta da Bruma, e de chá preto, Broken Leaf, preparadas com tempos de extracção de 0, 5, 15, 30 e 60 minutos.

3.2 - Parte Experimental

3.2.1 - Amostragem

Os chás verdes, pretos e vermelhos, bem como as tisanas de ervas, utilizados neste trabalho foram adquiridos no comércio local de Portugal (território continental) ou foram fornecidos pelas fábricas de chás Gorreana e Porto Formoso, situadas na ilha de S. Miguel, arquipélago dos Açores.

Para mais fácil referência das amostras, apresenta-se na tabela seguinte (Tabela 3.8) os chás verdes e pretos, já apresentados no ponto 2.2.1 (Tabela 2.5), e as amostras de chás e tisanas incluídas neste trabalho.

Tabela 3. 8 – Identificação dos chás verdes, pretos e vermelhos e tisanas estudados sob a forma de infusões.

| Tipo de Infusão | Marca | Variedade | Apresentação | Composição | Código |
|-----------------|----------------------|-------------------|---------------------|--|--------|
| Chá Verde | Gorreana | Tradicional | Folha enrolada | 100% chá verde | VA1 |
| | | Encosta de Bruma | Folhas | 100% chá | VA2 |
| | | Hysson | Folhas | 100% chá | VA3 |
| | Tetley | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá verde | VC1 |
| | Tley | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá verde | VC2 |
| | Salutem | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá verde | VC3 |
| | | ----- | Triturado, saquetas | 95% chá verde + 5% raízes de ginseng | VC4 |
| Chá preto | Lipton | ----- | Triturado, saquetas | 88.7% Chá verde + 7.2% folhas de menta + 4.1% aroma de menta | VC5 |
| | Gorreana | Orange Pekoe | Folhas | 100% chá | PA1 |
| | | Pekoe | Folhas | 100% chá | PA2 |
| | | Broken Leaf | Folhas | 100% chá | PA3 |
| | | Moinha | Folhas | 100% chá | PA4 |
| | Porto Formoso | Pekoe | Folhas | 100% chá | PA5 |
| | Li Cungo | ----- | Triturado | 100% chá preto (Moçambique) | PC1 |
| | Whiteeard of Chelsea | English Breakfast | Triturado | 100% chá ceilão (Sri Lanka) | PC2 |
| | Lipton | Earl Grey | Triturado, saquetas | 89.3% Chá preto + 10.2% Aroma natural de bergamota + 0.5% pétalas (bluef e jasmim) | PC3 |
| | Tetley | ----- | Triturado, saquetas | 100% chá preto | PC4 |
| | Lipton | ----- | Triturado, saquetas | 86.6% chá preto + 10.7% aromas + 2.7% casca de limão | PC5 |
| | Tley | ----- | Triturado, saquetas | 50% canela + 40% chá preto + 8% aroma de canela + 2% aroma de laranja | PC6 |

Tabela 3.8 (Continuação)

| Tipo de Infusão | Marca | Variedade | Apresentação | Composição | Código |
|-----------------|-----------|----------------------|---------------------|--|--------|
| Chás vermelho | Lipton | Red Tea | Triturado, saquetas | 53.8% chá preto + 35.3% Rooibos + 6.4% hibisco + 4.3% aromatizantes | V1 |
| | Diese | --- | Triturado, saquetas | 100% Rooibos | V2 |
| | Tetley | Rooibos Orange | Triturado, saquetas | 90% Rooibos + 9% aroma natural de laranja + 1% pedaços de laranja | V3 |
| | Erva Pura | Vermelho | Folhas | 100% chá vermelho (yunnan pu erh tea) | V4 |
| Tisanas | Tetley | Tília | Triturado, saquetas | 100% Tília | T1 |
| | Tetley | Melissa – Cidreira | Triturado, saquetas | 100% Cidreira | T2 |
| | Tetley | Menta | Triturado, saquetas | 100% menta | T3 |
| | Lipton | Morroco - Menta | Triturado, saquetas | 27.1% canela + 2.5% chicória, roseira brava, alcaçuz, casca de laranja, aroma natural, menta | T4 |
| | Tley | Camomila | Triturado, saquetas | 100% Camomila | T5 |
| | Lipton | Verbena - Lúcia-Lima | Triturado, saquetas | 100% Lúcia-Lima | T6 |

As amostras adquiridas foram armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e da humidade.

3.2.2 – Preparação das infusões (0, 5, 15, 30 e 60 min)

Os chás foram preparados colocando 0,5 g de chá ou tisana em 50,0 mL de água destilada fervente. Os tempos de infusão foram de 0, 5, 15, 30 e 60 min, sem agitação. Após este tempo filtraram-se as infusões através de papel de filtro e armazenaram-se em recipientes de plástico estéreis, a -20°C, num congelador horizontal (Eurofront, Uruguai, Teixeira e Ramalho, SA) até posterior análise.

3.2.3 – Preparação do extracto aquoso (60 min)

Ver procedimento descrito no ponto 2.2.3

3.2.4 – Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi feita pelo método Folin-Ciocalteu. Ver procedimento descrito no ponto 2.2.7.

3.2.5 - Determinação da actividade antioxidante das infusões

3.2.5.1 - Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

As infusões foram analisadas por adaptação do método descrito por Brand-Williams e colaboradores (Brand-Williams *et al.*, 1995) e revisto por Sharma e Bhat (2009). Este método baseia-se na redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 517 nm. Assim, preparou-se uma solução-mãe de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Fluka, Steinheim, Germany) em metanol (grau puro, José Manuel Gomes dos Santos, Lda), com a

concentração de 2g/L. Efectuou-se a diluição de 3,3 mL da solução-mãe para um volume final de 100mL de forma a obter a solução de trabalho com a concentração aproximada de 66 mg/L. Estas soluções foram mantidas a 5°C e ao abrigo da luz durante a sua utilização. A estabilidade das soluções foi periodicamente testada com padrões de ácido gálico. As amostras de infusões e chás foram diluídas usando factores de diluição entre de 1:1 e 1:60.

A 4,0 mL da solução de DPPH (66 mg/L) foi adicionado um volume de 0,5 mL de amostra diluída e a mistura foi incubada no escuro à temperatura de 22°C, durante 15 min. Após esse período foi lida a absorvância da solução a 517 nm usando um espectrofotómetro UV-VIS (Novaspec®II Rapid, Pharmacia).

A inibição do radical DPPH pelas amostras diluídas foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = [(A(\text{branco}) - A(\text{amostra})) / A(\text{Branco}) * 100]$$

onde A(branco) e A(amostra) são as absorvâncias de água e da amostra, respectivamente, nas condições de teste.

A inibição do radical DPPH pelos chás e infusões não diluídas foi avaliada em equivalentes de ácido gálico (mg/L), utilizando uma recta de calibração traçada com padrões de concentração na gama de 2,5 a 25 mg de ácido gálico/L.

As determinações foram realizadas em duplicado para cada amostra.

3.2.5.2 - Actividade antioxidante de redução férrica (FRAP)

O ensaio FRAP (poder antioxidante de redução férrica) mede seja capacidade de redução de iões férricos (Fe^{3+}) a iões ferrosos (Fe^{2+}), a valores de pH baixo; a detecção dos iões ferrosos é efectuada mediante a formação de um complexo corado azul (complexo ferroso 2,4,6 - tripiridil-s-triazina). Com este método é uma adaptação do procedimento descrito por Benzie e Strain (1996).

Preparou-se o reagente FRAP, juntando uma solução de tampão acetato 300 mM (pH=3.6) (1,5500 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) e 8,0 mL CH_3COOH glacial (PA-ACS-ISO, Panreac, Barcelona, Spain) em 500mL), solução ácida do complexo de 2,4,6 - tripiridil-s-triazina e Ferro III (TPTZ) 10 mM (0,0310 g TPTZ (Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) em HCl 40 mM (HCl - 37%, Merck, Darmstadt, Germany) e solução de cloreto de ferro III hexahidratado 20 mM (0,0540 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Himedia Laboratories, Bombaim, Índia) em 10 mL H_2O). A mistura destas soluções faz-se numa razão de 10:1:1.

A 3,0 mL de solução foi adicionado um volume de 0,3 mL de infusão e a mistura incubada num banho a 37 °C, durante 4 min.

Os valores de absorvância são lidos no espectrofotómetro UV-VIS (Novaspec®II Rapid, Pharmacia) a um comprimento de onda de 593 nm.

As determinações foram realizadas em duplicado para cada amostra e os valores expressos em mg/L infusão.

3.2.6 – Análise dos compostos fenólicos das infusões por HPLC

A determinação do perfil de compostos fenólicos foi efectuada num sistema de HPLC Spectrophysics (Spectrophysics, São José, USA) compreendendo um desgaseificador (Spectra system SCM1000), uma bomba binária (Spectra system P2000), um amostrador automático (Spectra system AS1000) e um detector de vector de diodos UV 6000LP (Spectra system SN4000) sendo o funcionamento deste sistema controlado pelo programa informático, Xcalibur Ink 2.0.6 (Thermo).

A separação foi realizada numa coluna C-18 de fase reversa (UP-5ODB-25K, Uptisphere 5 μ ODB, Interchrom, Paris, França). As amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de celulose de 22 μ m (BGB Analytik, Alexandria, USA) após o que se efectuou a injeção de uma alíquota de 20 μ L. A fase móvel foi constituída por ácido fórmico a 0,5% (eluente A) e uma mistura de ácido fórmico (Panreac, Barcelona, Espanha), acetonitrilo (Baker HPLC analyzed, J.T.Baker, UK) e água desionizada (obtida através do sistema Milli-Q (Millipore, Molsheim, France) na razão de 5:400:595 (eluente B). Todos os solventes foram desgaseificados em banho de ultrassons (Selecta, Barcelona, Espanha) antes da sua utilização.

A eluição foi realizada a um fluxo constante de 0,70 mL/min utilizando a seguinte programação da bomba: início da eluição com 100% de eluente A, seguindo-se um gradiente linear até 80% de A, durante 15 min e um período isocrático de 10 min; de seguida efectuou-se um gradiente até 30% de A num período de 35 min e um período isocrático de 5 min; finalmente programou-se um gradiente até 0% de A, em 10 min e um período isocrático de 5 min. Programou-se o retorno da coluna às condições iniciais (100% de A), num período de 20 min seguido de um período isocrático de 3 min (Bravo *et al.*, 2006).

Os cromatogramas foram adquiridos na gama de comprimentos de onda entre 200 e 600 nm e aos comprimentos de onda selectivos de 280 nm, 320 nm e 360 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação dos respectivos tempos de retenção e dados espectrais com dados análogos de padrões autênticos e resultados publicados na literatura. Todas as análises foram efectuadas em duplicado e sempre que o desvio padrão relativo da área cromatográfica absoluta excedeu 10 % repetiu-se a análise.

A concentração dos compostos foi avaliada em termos absolutos utilizando rectas de calibração construídas com padrões cromatográficos na gama de concentrações típicas dos chás e, em termos relativos, como percentagem da área cromatográfica total.

3.2.6.1 – Preparação e análise das soluções padrão

Os padrões utilizados neste trabalho, nomeadamente, os ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico (G7384 Sigma), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (08992 Fluka), ácido clorogénico (C3878 Aldrich), ácido cafeico (C0625 Sigma), ácido coumárico (C9008 Sigma) e ácido ferúlico (128708 Aldrich)), os flavonoides (procianidina B2 (42157 Fluka), isoquercitrina (00140585 Fluka), hidrato de quercitrina (Q3001 Sigma), dihidrato de floridzina (P3449 Sigma), quercitina (Q4951 Sigma) e fletina (P7912 Sigma)) e as catequinas (cafeína, (-)-Catequina 3-galato, (-)-Epicatequina, (-)-Epicatequina-3-galato, (-)-Epigallocatequina 3-galato, (-)-Galocatequina e (-)-Galocatequina 3-galato) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Química, S.L., Portugal.

As catequinas apresentavam-se em solução, numa mistura de catequinas do chá verde (G-016 Cerilliant) em que cada um dos componentes tem a concentração de 100 μ g/mL em acetonitrilo: água (8:2) com 5% HCl (1M), numa ampola com o volume de 1,0 mL. Todos os outros padrões se apresentavam em pó.

As soluções concentradas de ácidos benzoicos (9000 mg/L) e de flavonoides (1000 mg/L), com excepção da procianidina B2 (180 mg/L) foram individualmente preparadas dissolvendo o peso apropriado de cada composto em metanol. As soluções mais diluídas de cada ácido benzoico (90 mg/L) e de cada flavonoide (100 mg/L), com excepção da procianidina B2 (90 mg/L) também foram preparadas individualmente em metanol. Várias misturas contendo todos os ácidos benzoicos, nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L de cada composto foram preparadas em metanol e

utilizadas como misturas padrão para as curvas de calibração. Várias misturas contendo todos os flavonóides, em concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/L de cada composto foram preparadas em metanol e utilizadas como misturas padrão para as curvas de calibração. Foram ainda preparadas soluções diluídas, a partir da solução de catequinas, com concentrações de 12, 25, 50 e 100 mg/L de cada uma das catequinas, que foram utilizadas no traçado das curvas de calibração.

As soluções padrão foram injectadas em HPLC e as áreas dos picos correspondentes foram registadas. Traçaram-se curvas de calibração para cada padrão representando graficamente a concentração (eixo X) *versus* a área de pico cromatográfico correspondente. Estas curvas foram utilizadas para determinar as concentrações destes padrões nas amostras analisadas. Quando não foi possível obter o padrão correspondente utilizou-se a curva de calibração de um composto da mesma família, por exemplo ácido gálico para quantificar ácidos hidroxibenzóicos ou quercetina para quantificar flavonoides expressando-se a concentração em equivalentes do padrão utilizado.

3.2.7 – Tratamento estatístico

As análises foram efectuadas em duplicado e os resultados obtidos foram expressos como a média e o desvio padrão.

O desvio padrão relativo ou coeficiente de variação foi calculado como a razão entre o desvio padrão e a média e expresso em percentagem.

Os chás incluídos neste trabalho foram agrupados em função do tipo de chá, presença de aditivos e origem geográfica, e os diferentes grupos homogéneos foram calculadas as médias e desvios padrão das variáveis em estudo, para os grupos considerados.

A análise estatística foi realizada usando SPSS ® 19.0 e os módulos de tratamento estatístico do software Excel. Foi efectuada uma análise de variância (ANOVA) para determinar se existem diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$) e utilizou-se o teste de Tukey para efectuar comparações múltiplas entre médias de forma agrupá-las em conjuntos homogéneos.

Para as diferentes variáveis determinadas neste trabalho avaliou-se a existência de correlações lineares significativas através do cálculo do coeficiente de correlação de Pearson. Os critérios de interpretação deste coeficiente foram os seguintes (Callegari-Jacques, 2003): Se $0,00 < |r| < 0,30$, existe uma correlação fraca; Se $0,30 \leq |r| < 0,60$, existe uma correlação moderada; Se $0,60 \leq |r| < 0,90$, existe uma correlação forte; Se $0,90 \leq |r| < 1,00$, existe correlação muito forte.

3.3 – Apresentação e Discussão de Resultados

Neste capítulo apresentam-se resultados relativos ao teor de compostos fenólicos totais e ao poder antioxidante (DPPH[•] e FRAP) de 19 infusões de folhas de chá obtidas por infusão durante 5 min, 15 min e 30 min. Para as infusões de 5 minutos foram ainda analisados quatro chás vermelhos e seis tisanas.

Avaliou-se ainda o perfil dos compostos fenólicos de 19 infusões de folhas de chá obtidas por infusão durante 15 min e dos correspondentes extractos aquosos.

3.3.1 - Optimização de parâmetros experimentais

Antes de aplicar os métodos analíticos de avaliação do teor de compostos fenólicos (reacção de Folin-Ciocalteu), e de determinação da actividade antioxidante (inibição do DPPH[•] e actividade de redução férrica, FRAP), à totalidade das amostras incluídas neste estudo efectuaram-se alguns estudos prévios de forma a otimizar os parâmetros reacionais de cada metodologia às características da matriz em estudo.

3.3.1.1 – Optimização de parâmetros da reacção de Folin-Ciocalteu - Variação do tempo de reacção no escuro e influência da centrifugação

A optimização da reacção de Folin-Ciocalteu foi anteriormente apresentada (Ver ponto 2.3.1.1.) e as condições de teste seleccionadas correspondem ao tempo de reacção de 30 minutos uma vez que se considerou que a reacção estava próxima do estado de equilíbrio e não obrigava a períodos de incubação muito longos.

3.3.1.2 – Optimização de parâmetros da reacção de DPPH[•] - Variação do tempo de reacção no escuro

A amostra utilizada nestes testes foi uma infusão de chá verde Gorreana, folha enrolada (VA1), com um tempo de infusão de 5 min e uma razão chá:água de 1:500.

A influência do tempo de incubação no escuro (tempo de reacção) nos resultados da reacção de inibição do DPPH[•] foi avaliada entre 5 min e 60 min. Assim, repetiram-se os procedimentos descritos para este método variando apenas o tempo de reacção no escuro. Por determinação da % de inibição obtiveram-se os seguintes resultados:

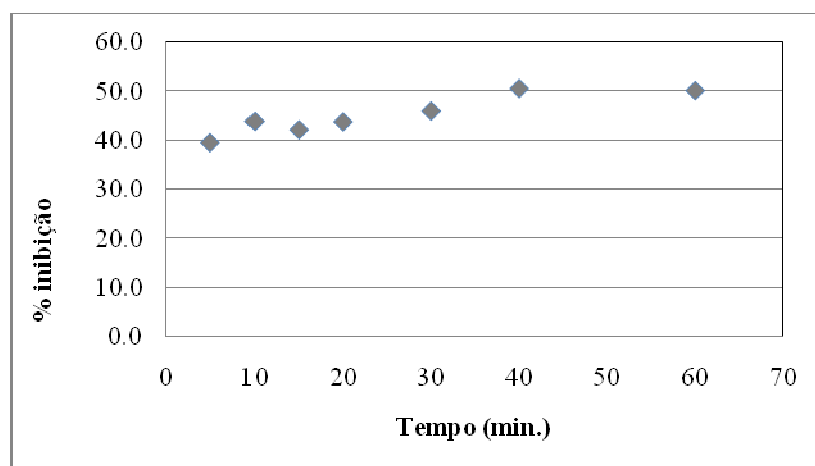


Figura 3. 7 – Variação da % de inibição em função do tempo de incubação, no escuro, da reacção de DPPH*.

Em face dos resultados obtidos seleccionou-se o tempo de reacção de 15 min para os ensaios subsequentes pois considerou-se que após este período, a reacção estava próxima do estado de equilíbrio e não obrigava a períodos de incubação muito longos.

3.3.1.3 – Optimização de parâmetros da reacção de redução férrica (FRAP) - Variação do tempo de reacção no escuro

A amostra utilizada nestes testes, tal como no teste do radical DPPH*, foi uma infusão de chá verde Gorreana, folha enrolada (VA1), com um tempo de infusão de 5 min e uma razão chá:água de 1:500. A influência do tempo de incubação a 37°C (tempo de reacção) nos resultados da reacção de FRAP foi avaliada entre 2 min e 30 min. Assim, repetiram-se os procedimentos descritos para este método variando apenas o tempo de reacção. Por determinação da absorvância obtiveram-se os seguintes resultados:

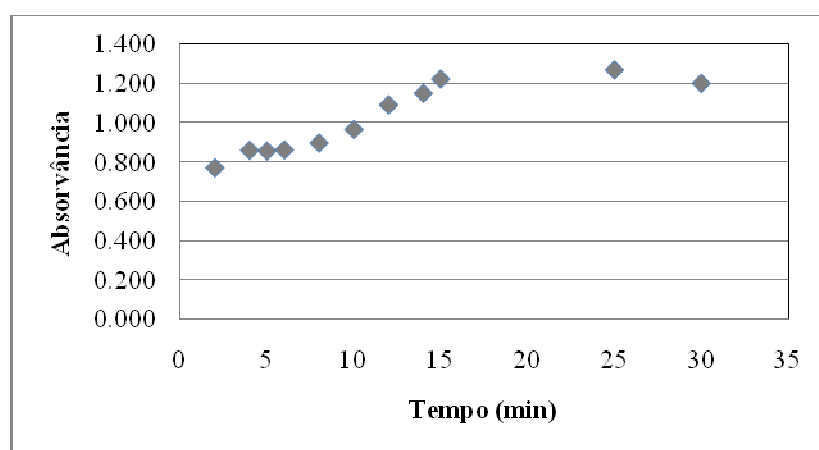


Figura 3. 8 – Variação da absorvância em função do tempo de incubação da reacção de redução férrica (FRAP).

Em face dos resultados obtidos seleccionou-se o tempo de reacção de 4 min para os ensaios subsequentes pois considerou-se que após esse período, a reacção estava próxima do estado de equilíbrio e não obrigava a períodos de incubação muito longos.

3.3.1.4 –Repetibilidade

Efectuaram-se 8 infusões independentes deste chá com uma razão chá:água de 1:500 sendo cada uma delas submetida às condições para a determinação da capacidade antioxidante pelos testes de Folin-Ciocalteu, inibição do radical DPPH[•] e poder de redução férrica (FRAP). Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 3.9, à excepção dos obtidos para o método Folin-Ciocalteu uma vez que já foram apresentados no ponto 2.3.1.3. O método Folin-Ciocalteu apresentou uma boa repetibilidade tendo-se obtido, na determinação do teor de compostos fenólicos totais para diferentes amostras, um desvio padrão relativo que não excedeu os 5%.

Tabela 3. 9 – Inibição do radical DPPH[•] expressa em % e do poder redutor férrico expresso em mg GAE/L infusão, para diferentes amostras de chá Gorreana – Folha Enrolada (n=8).

| Replicadas (n=8) | % inibição | FRAP (mg GAE/L) |
|-----------------------------|-------------------|------------------------|
| 1 | 28,6 | 17,6 |
| 2 | 28,1 | 17,7 |
| 3 | 27,9 | 17,6 |
| 4 | 26,8 | 17,8 |
| 5 | 28,1 | 17,5 |
| 6 | 28,6 | 17,6 |
| 7 | 29,5 | 17,8 |
| 8 | 27,4 | 17,7 |
| Média | 28,1 | 17,7 |
| Desvio Padrão | 0,80 | 0,2 |
| Desvio Relativo (%) | 2,90 | 0,9 |

Qualquer dos métodos apresentou uma boa repetibilidade tendo-se obtido um desvio padrão relativo de 2,90% para o método do radical DPPH[•] e de 0,9% para a metodologia FRAP. Estes resultados permitem concluir que nas condições seleccionadas os efeitos de matriz e as condições reaccionais seleccionadas não introduzem factores de variabilidade que influenciem de forma importante a determinação da % de inibição do DPPH[•] e do poder redutor férrico para as infusões de 5 min.

Foi também determinada a repetibilidade do método de análise do HPLC. Assim, foram injectadas 5 amostras de infusões de 15 min de chá verde (Encosta da Bruma) e de chá preto (Broken Leaf). A repetibilidade do método foi obtida pela determinação da média das áreas absolutas dos picos identificados a 280 nm, por ser a este comprimento de onda que são detectados os compostos maioritários dos chás analisados, e o respectivo desvio padrão e desvio relativo. Os valores obtidos são listados na tabela 3.10.

Tabela 3. 10 – Média, desvio padrão e desvio relativo das áreas absolutas dos picos identificados a 280 nm nos chás dos Açores Encosta da Bruma (chá verde) e Broken Leaf (chá preto).

| Chá verde – Encosta da Bruma | | | | Chá preto – Broken Leaf | | | |
|------------------------------|----------|---------------|---------------------|-------------------------|----------|---------------|---------------------|
| Picos | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Picos | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| A1 | 4106005 | 549018,5 | 13,37 | D2 | 6926922 | 1019056 | 14,71 |
| A2 | 4016762 | 680198,3 | 16,93 | D3 | 1131510 | 76338,79 | 6,75 |
| A6 | 3806800 | 372350,9 | 9,78 | D4 | 1031747 | 70107,45 | 6,80 |
| A7 | 63143500 | 2614633 | 4,14 | D5 | 1049749 | 150036,9 | 14,29 |
| A8 | 6290400 | 960089,1 | 15,26 | D6 | 43611046 | 1287837 | 2,95 |
| A9 | 26668205 | 3044174 | 11,41 | | | | |
| A10 | 1517022 | 96027,44 | 6,33 | | | | |
| A12 | 10751334 | 1096894 | 10,20 | | | | |

Esta determinação visou avaliar a repetibilidade do sistema cromatográfico antes de proceder à análise das amostras e verificar se seria necessário efectuar alguma modificação nas condições de análise seleccionadas. Os desvios padrão relativos variaram entre 2,95% e 16,93% mas como estes ensaios foram realizados no início da utilização do sistema de HPLC os valores obtidos foram um pouco superiores aos posteriormente registados nos duplicados de amostra. Com o desenrolar dos ensaios a coluna cromatográfica foi estabilizando diminuindo o desvio padrão relativo nas medições efectuadas. Estabeleceu-se o desvio padrão percentual de 10% como um critério de aceitação ou seja, sempre que a variação percentual na área absoluta dos duplicados foi maior que 10 %, a análise foi repetida.

3.3.2 - Actividade antioxidante de infusões de chás e tisanas

A actividade antioxidante das amostras de chá verde e preto obtidas por infusão das folhas de chá durante 5, 15 e 30 minutos foi avaliada por determinação do seu conteúdo de fenólicos totais, pelo método da sequestração do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) e pela determinação do poder de redução férrica (FRAP). Todos os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg/L de chá).

3.3.2.1 – Fenólicos totais

Em relação às infusões de 5 e 15 minutos de chás verdes e pretos já foram feitos os respectivos comentários no ponto 2.3.3.3.

No entanto, referindo os resultados individuais para cada infusão e pela análise dos resultados obtidos verificou-se que, nas infusões de 5 minutos, a maior quantidade de fenólicos totais extraída das folhas de chá, significativamente superior aos chás analisados, foi observada no chá verde comercial (VC1) com um teor de $817,81 \pm 1,74$ mg/L de infusão, enquanto a menor quantidade foi no chá preto “Gorreana Broken Leaf” (PA3) com um teor $129,02 \pm 3,00$ mg/L de infusão, o qual foi significativamente inferior aos chás analisados.

Relativamente às infusões de 15 minutos, a maior quantidade de fenólicos totais extraída das folhas de chá, significativamente superior aos outros chás, foi verificada no chá verde comercial com menta (VC5) com o teor de $942,48 \pm 3,76$ mg/L de infusão, enquanto a menor quantidade foi no chá preto “Gorreana Broken Leaf” (PA3) com um teor de $152,47 \pm 2,89$ mg/L de infusão. Os chás pretos dos Açores apresentaram teores de fenólicos totais significativamente inferiores aos outros.

No que diz respeito às infusões de 30 minutos, os teores de fenólicos mais elevados foram obtidos no chá verde com menta (VC4) e no chá verde Saltem (VC3) com valores de $991,74 \pm 8,82$ e de $983,29 \pm 1,05$ mg GAE/L de infusão, sendo estes valores significativamente superiores a todos os

outros chás analisados. A infusão que apresentou menor teor de fenólicos totais foi a de chá preto Gorreana Broken Leaf, com um valor de $187,20 \pm 1,92$ mg GAE/L de infusão, significativamente inferior aos restantes chás.

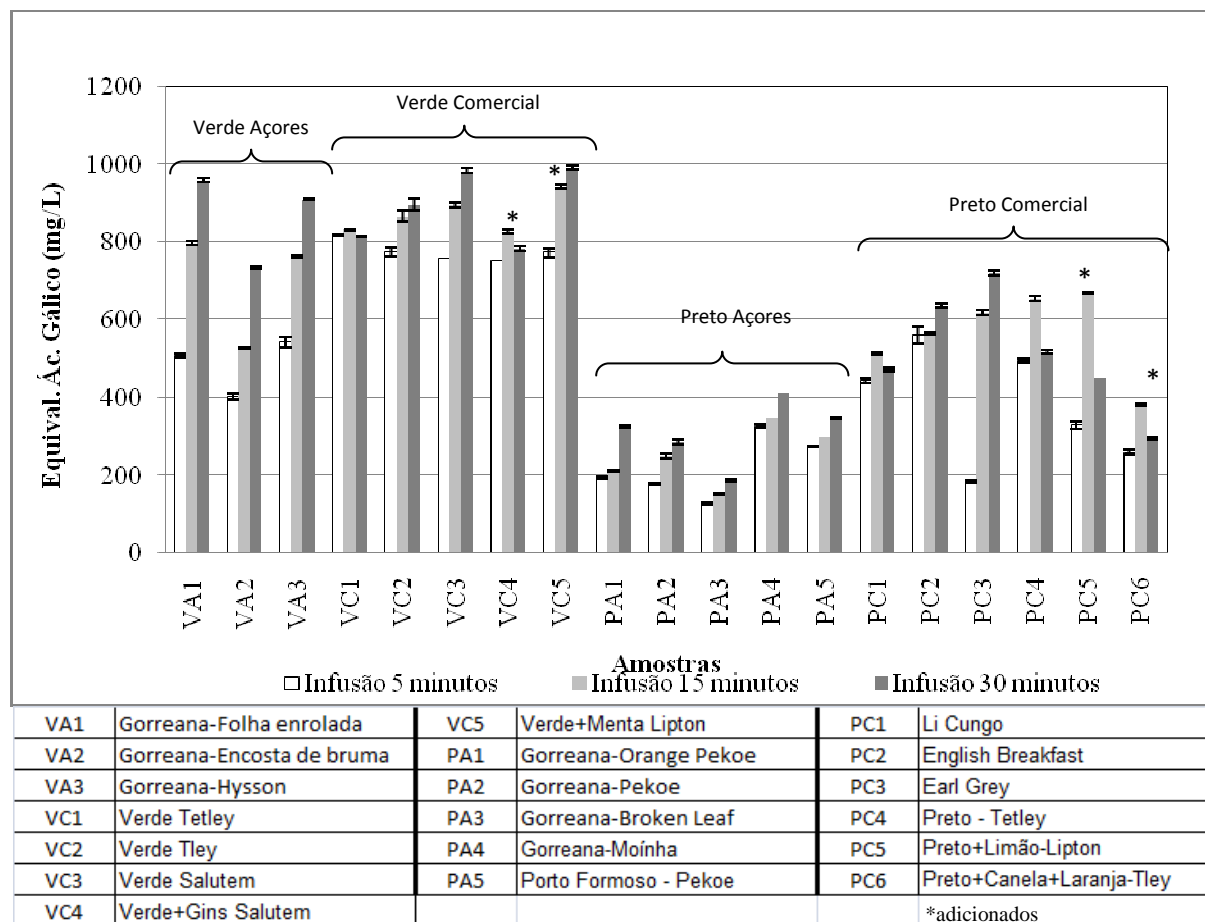


Figura 3. 9 – Teor de fenólicos totais das amostras de infusões de 5, 15 e 30 minutos analisadas.

Para as infusões de 30 minutos, os chás verdes apresentaram teores médios de fenólicos totais significativamente superiores aos dos chás pretos, tal como aconteceu com as mesmas infusões com tempos de 5 e 15 min. Esta observação está de acordo com o referido por diferentes autores que observaram um maior teor de compostos fenólicos em chás verdes do que nos correspondentes chás pretos devido à transformação e degradação das catequinas monoméricas durante o processo de fermentação do chá (Kim *et al.*, 2011).

Analisando a influência do tempo de infusão nos teores de fenólicos totais para cada grupo de chás (Tabela 3.11), verifica-se que o aumento do tempo de infusão se traduziu num aumento proporcional dos teores de fenólicos totais dos chás verdes dos Açores não se observando um efeito tão pronunciado nos chás verdes comerciais; em particular, nos chás verdes dos Açores a infusão de 5 minutos tem um teor de compostos fenólicos significativamente inferior aos das infusões de 15 e 30 minutos. Este diferente comportamento parece ser uma consequência da diferente granulometria destas amostras uma vez que as amostras de chá verde dos Açores são como já foi referido constituídas por folhas não trituras. No entanto quando o tempo de extração aumentou de 5 min para 15 min e 30 min as diferenças entre os chás verdes dos Açores e os chás verdes comerciais atenuaram-se e os valores de fenólicos totais foram idênticos para chás destes dois grupos.

Os chás pretos comerciais avaliados neste trabalho apresentaram teores de compostos fenólicos totais bastante diversos entre si, em qualquer dos três tempos de infusão considerados e tal como no caso dos chás verdes dos Açores também os chás pretos dos Açores apresentaram teores de compostos fenólicos geralmente inferiores aos seus congéneres comerciais, o que indica que também no caso dos chás pretos, a granulometria afecta a cinética de dissolução dos compostos fenólicos da folha do chá. Esta hipótese é consistente com o facto de o chá preto Gorreana – Moinha (PA4), que apresenta a menor granulometria de entre os chás pretos dos Açores uma vez que é constituído pelas folhas trituradas que ficam nos recipientes onde se efectuou a fermentação após a recolha das folhas de chá fermentado que constituem as restantes variedades de chá preto.

De uma forma geral os chás pretos (quer os dos Açores quer os comerciais) apresentaram uma menor variação do teor de compostos fenólicos totais em função do tempo de infusão do que a observada para os chás verdes, excepto no caso do chá preto comercial Earl Grey que apresentou um aumento muito importante do teor de fenólicos entre o tempo de infusão de 5 min e os tempos de 15 min e 30 min. Esta observação sugere que a cinética de extracção dos compostos fenólicos do chá preto é diferente da do chá verde, o que pode dever-se às diferenças na natureza química dos compostos extraídos. Por outro lado, as alterações sofridas pelas folhas de chá durante o processo de fermentação podem permitir uma maior facilidade de penetração da água na matriz e uma mais fácil transferência dos compostos fenólicos para a solução.

Nos chás pretos adicionados, as infusões de 5 minutos são significativamente diferentes das infusões de 15 minutos, mas aos 30 minutos as diferenças deixam de ser significativas em relação às infusões de 5 e 15 minutos. Neste grupo de chás o teor médio de fenólicos totais aumenta dos 5 para os 15 minutos, para reduz-se aos 30 minutos de infusão, ao contrário do que se verifica para os outros grupos que aumentam os teores médios de fenólicos totais dos 5 para os 15 minutos e dos 15 para os 30 minutos aumentam os estabilizam.

Tabela 3. 11 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais dos diferentes tipos de infusões, de 5, 15 e 30 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| Teor de fenólicos (mg/L) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
| Média | 484,18 ^{cde} | 782,32 ^{hi} | 761,97 ^{ghi} | 220,77 ^a | 419,70 ^{bcde} | 294,46 ^{abc} | 457,63 |
| Desvio Padrão | 64,73 | 29,06 | 13,75 | 75,06 | 152,25 | 40,57 | 228,39 |
| Coeficiente de Variação (%) | 13,37 | 3,72 | 1,80 | 34,00 | 36,28 | 13,78 | 49,91 |
| Teor de fenólicos (mg/L) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 695,16 ^{fgh} | 864,17 ^{hi} | 884,21 ^{hi} | 253,19 ^{ab} | 586,67 ^{efg} | 525,30 ^{def} | 584,72 |
| Desvio Padrão | 131,24 | 29,28 | 67,32 | 72,22 | 58,20 | 165,86 | 247,75 |
| Coeficiente de Variação (%) | 18,88 | 3,39 | 7,61 | 28,53 | 9,92 | 31,57 | 42,37 |

~

Tabela 3.11 (Continuação)

| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| Teor de fenólicos (mg/L) – Infusões 30 minutos | | | | | | | |
| Média | 867,36 ^{hi} | 898,01 ⁱ | 886,79 ^{hi} | 312,37 ^{abc} | 585,77 ^{efg} | 374,48 ^{abcd} | 617,03 |
| Desvio Padrão | 106,64 | 75,81 | 121,30 | 78,71 | 105,10 | 89,67 | 265,03 |
| Coeficiente de Variação (%) | 12,30 | 8,44 | 13,68 | 25,20 | 17,94 | 23,94 | 42,95 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre médias, de acordo com o teste de Tukey.

Considerando agora a evolução da média dos teores de fenólicos totais para cada grupo de chás em função do tempo de infusão (Tabela 3.11), verifica-se que este parâmetro afectou de forma significativa a média dos teores de fenólicos totais no caso dos chás verdes dos Açores e os chás pretos comerciais adicionados. Nos chás verdes dos Açores a infusão de 5 minutos é significativamente diferente das infusões de 15 e 30 minutos. Nos chás pretos adicionados, as infusões de 5 minutos são significativamente diferentes das infusões de 15 minutos, mas aos 15 minutos as diferenças deixam de ser significativas em relação às infusões de 5 e 15 minutos. Nos restantes grupos a heterogeneidade entre as amostras consideradas contribui certamente para que em termos médios não se observem diferenças significativas entre os teores de fenólicos destes grupos de chás.

Para alguns chás pretos (PC4, PC5 e PC6), o teor de fenólicos totais aumenta dos 5 para os 15 minutos, mas reduz-se aos 30 minutos de infusão, ao contrário do que se verifica para os outros chás para os quais os teores de fenólicos totais aumentam ou estabilizam quando o tempo de infusão aumenta.

Um comportamento análogo foi observado por Ramalho e colaboradores (Ramalho *et al.*, 2013) que estudaram a influência do tempo e temperatura de infusão na extracção de compostos fenólicos a partir de chá preto. Estes autores verificaram que o teor de fenólicos totais nas infusões aumentou entre os 5 e 15 minutos, para a maior parte dos chás analisados mas diminuiu para várias amostras quando o tempo de infusão aumentou de 15 min para 30 min.

Esta variação do teor de fenólicos de chás pretos em função do tempo de extracção pode resultar de reacções de polimerização ou degradação que podem ocorrer entre os componentes fenólicos destes chás, após a sua extracção e que os convertem em formas com menor resposta específica no teste de Folin-Ciocalteu. Por outro lado, estes autores referem que, ao longo do tempo de infusão ocorre certamente a dissolução de diferentes classes de compostos pois a temperatura da infusão vai descendo gradualmente a partir dos 100 °C; a natureza e concentração dos compostos fenólicos extraídos ao longo do tempo, às diferentes temperaturas, são também influenciadas pela origem dos chás e nomeadamente pelas condições de cultivo, sol, clima, práticas de colheita e processamento, o que explica as diferenças observadas entre as diferentes infusões preparadas em condições idênticas (Ramalho *et al.*, 2013).

A temperatura de infusão, a razão chá:água e a velocidade de arrefecimento do chá foram parâmetros abordados por Nishiyama e colaboradores (Nishiyama *et al.*, 2010), que avaliaram a influência destes parâmetros no teor fenólico das infusões. Estes autores utilizaram volumes diferentes de água para

preparar infusões com a mesma razão chá:água e o mesmo tempo de infusão e verificaram que para volumes maiores de infusão preparada, a velocidade de arrefecimento é menor pelo que a temperatura final é mais elevada e o mesmo se verifica com o teor de fenólicos totais.

O teor de fenólicos totais dos chás verdes e pretos preparados com 5 min de tempo de infusão foi também comparado com o mesmo teor de chás vermelhos e tisanas preparados em condições idênticas (figura 3.10). Verificou-se que as tisanas apresentam teores de compostos fenólicos bastante variáveis desde o chá de camomila (T5) com um teor de $77,04 \pm 0,69$ mg GAE /L, significativamente inferior a todos os outros chás e tisanas, até à tisana de cidreira que apresenta um teor de 640,74 mg GAE /L, superior aos apresentados pelos chás vermelhos e às médias dos teores determinados para todos os grupos de chás pretos e para os chás verdes dos Açores.

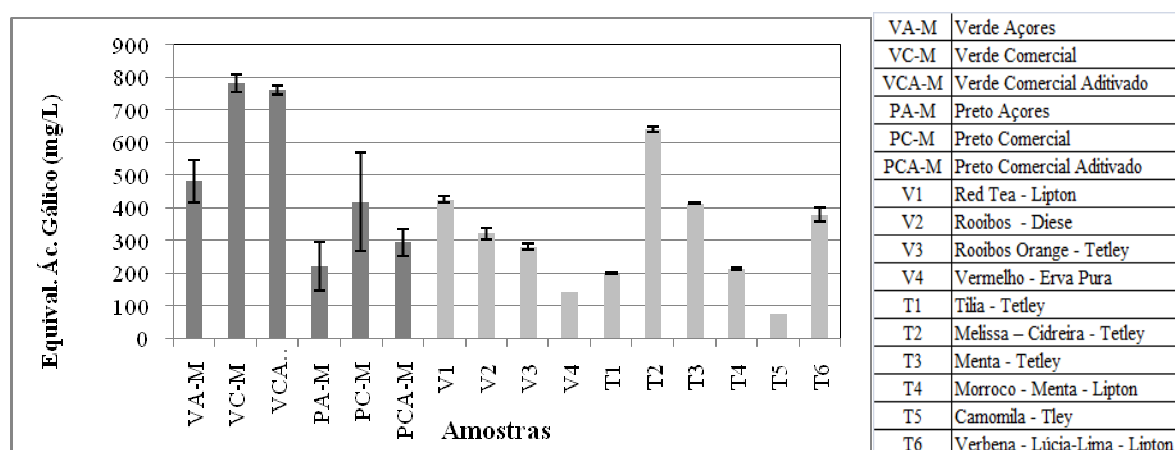


Figura 3. 10 – Teor de fenólicos totais das amostras de infusões de 5 minutos analisadas.

Ho e sua equipa (Ho *et al.*, 2010) determinaram teores de fenólicos para vários chás e tisanas preparados por infusão de 2,5 g de chá/tisana em 50 mL de água a 98°C durante 10 minutos e obtiveram os seguintes valores: 2720 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/L para o chá verde e de 2500 mg GAE /L para o chá preto, de 4590, de 2260 e de 1970 mg GAE /L para as tisanas de cidreira, menta e lúcia-lima, respectivamente (Ho *et al.*, 2010). Observaram-se assim relações semelhantes às encontradas neste trabalho, ou seja, a infusão de cidreira apresentou teores de fenólicos superiores às outras tisanas e aos chás pretos.

Os chás vermelhos apresentaram teores de fenólicos semelhantes às médias observadas para os chás pretos excepto a amostra V4 (chá vermelho Erva Pura) cujo teor de fenólicos foi significativamente inferior.

Comparando as médias dos teores fenólicos (Tabela 3.12) para os vários tipos de chás e tisanas preparados com 5 min de infusão verifica-se que os chás verdes comerciais (simples e adicionados) apresentam os teores significativamente superiores aos outros chás e tisanas. Verifica-se ainda que as tisanas e os chás vermelhos apresentam teores semelhantes as chás pretos comerciais (simples e adicionados), valores estes intermédios entre os chás pretos dos Açores e os chás verdes dos Açores.

Tabela 3. 12 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais dos diferentes tipos de infusões, de 5 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| Teor de fenólicos (mg/L) – Infusões 5 minutos | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|----------------------|--------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Chá Vermelho Comercial (n=4) | Tisanas (n=6) | Total |
| Média | 484,18 ^b | 782,32 ^c | 761,97 ^c | 220,77 ^a | 419,70 ^{ab} | 294,46 ^{ab} | 293,98 ^{ab} | 321,38 ^{ab} | 406,87 |
| Desvio Padrão | 64,73 | 29,06 | 13,75 | 75,06 | 152,25 | 40,57 | 108,25 | 191,12 | 217,70 |
| Coeficiente de Variação (%) | 13,37 | 3,72 | 1,80 | 34,00 | 36,28 | 13,78 | 36,82 | 59,47 | 53,51 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Katalinic e Jukic avaliaram o teor de fenólicos de infusões de cidreira, menta, tília, lúcia-lima e camomila, tendo obtido os valores mais elevados para a infusão de cidreira, seguida da infusão de menta e o teor mais baixo para a infusão de camomila, tal como observado no presente estudo (Katalinic *et al.*, 2006).

A tendência para o teor de compostos fenólicos decrescer segundo a ordem: chá verde > chá preto > chá vermelho > tisana de hortelã-pimenta foi também observada por Almajano e colaboradores em infusões preparadas a partir de 1,5 g de chá em 100 mL de água fervente durante 5 minutos (Almajano *et al.*, 2008).

O chá vermelho ou Rooibos é, como já foi referido, a infusão da planta Rooibos (*Aspalathus linearis*) que é bastante rica em componentes antioxidantes e em particular compostos fenólicos; as infusões desta planta podem realizar-se a partir da planta verde ou após um processo de oxidação das folhas análogo à fermentação utilizada na produção do chá preto a partir das folhas de *Camelia sinensis*. (Iswaldi *et al.*, 2011). Assim, apesar do elevado conteúdo de fenólicos que as infusões de Rooibos verde apresentam, é expectável que o processo de oxidação das folhas inclua os compostos fenólicos nelas contidos e que por isso deixam de estar disponíveis para reação no teste de Folin-Ciocalteu (Villano *et al.*, 2010).

Horzic e colaboradores estudaram o teor de fenólicos totais de infusões de chá verde, chá preto, tília e camomila, preparadas na razão de 2,0 g de chá em 200 mL de água e extraídas durante 3 minutos e obtiveram valores na gama de 350 mg GAE/L a 1850 mg GAE/L, segundo a ordem decrescente chá verde > chá preto > camomila > tília (Horzic *et al.*, 2009).

3.3.2.2 - Actividade antioxidante

A reacção de Folin-Ciocalteu avalia a capacidade redutora de uma dada amostra em relação ao reagente de Folin-Ciocalteu em particular em relação ao complexo de molibdénio e tungsténio que é reduzido do estado de oxidação VI ao estado de oxidação V, com consequente modificação no seu comprimento de onda de absorção. Assim os resultados da reacção de Folin-Ciocalteu são geralmente

apresentados como o teor de fenólicos totais da amostra mas sabe-se que essa é uma forma simplificada de interpretar os resultados deste teste pois se a matriz for rica em compostos redutores não fenólicos eles poderão também contribuir para o efeito redutor (Prior *et al.*, 2005). No caso do chá e outras infusões os compostos fenólicos são certamente os principais compostos redutores presentes na matriz pelo que a reação de Folin-Ciocalteu deverá permitir a sua avaliação de forma adequada. A quantificação da capacidade antioxidante das infusões foi ainda realizada através de dois métodos distintos: a eliminação/sequestração dos radicais de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) e a determinação da capacidade de redução de ferro (FRAP).

3.3.2.2.1 - Antiradicalar (DPPH[•])

A actividade de sequestração do radical DPPH[•] por parte das infusões obtidas com tempos de extracção de 5 min, 15 min e 30 min foi avaliada nas amostras diluídas e os valores correspondentes aos chás e infusões foram expressos em equivalentes de ácido gálico e calculados a partir de uma recta de calibração construída com padrões deste composto (figura 3.11).

Os chás verdes dos Açores apresentam actividade antiradicalar ligeiramente inferior aos chás verdes comerciais excepto no caso do chá verde Gorreana – Folha Enrolada (VA1) e o mesmo acontece com os chás pretos dos Açores excepto o chá Gorreana Moinha (PA4).

Ao contrário do teor de compostos fenólicos totais que de uma forma geral aumentou ou estabilizou à medida que o tempo de infusão aumentou, no caso da actividade antiradicalar observaram-se dois comportamentos distintos: os chás dos Açores (quer os verdes quer os pretos) apresentaram um padrão de aumento/estabilização da actividade antiradicalar em função do tempo de infusão demonstrando que a extracção de compostos com esta actividade ocorre gradualmente enquanto para os chás verdes comerciais e para a maior parte dos chás pretos comerciais a actividade antiradicalar foi superior após 5 min de extracção e diminuiu quando o tempo de infusão aumentou para 15 min e 30 min. Este comportamento observado para os chás comerciais parece indicar que para estes chás com menor granulometria os compostos responsáveis pela actividade antiradicalar são extraídos rapidamente após 5 min mas a sua concentração diminui à medida que a infusão prossegue devido a reacções de isomerização, oxidação ou polimerização. É expectável que idênticas reacções ocorram com os compostos antiradicalares extraídos dos chás dos Açores mas aparentemente a sua transferência progressiva das folhas para as infusões compensa essas reacções de conversão em formas não reactivas.

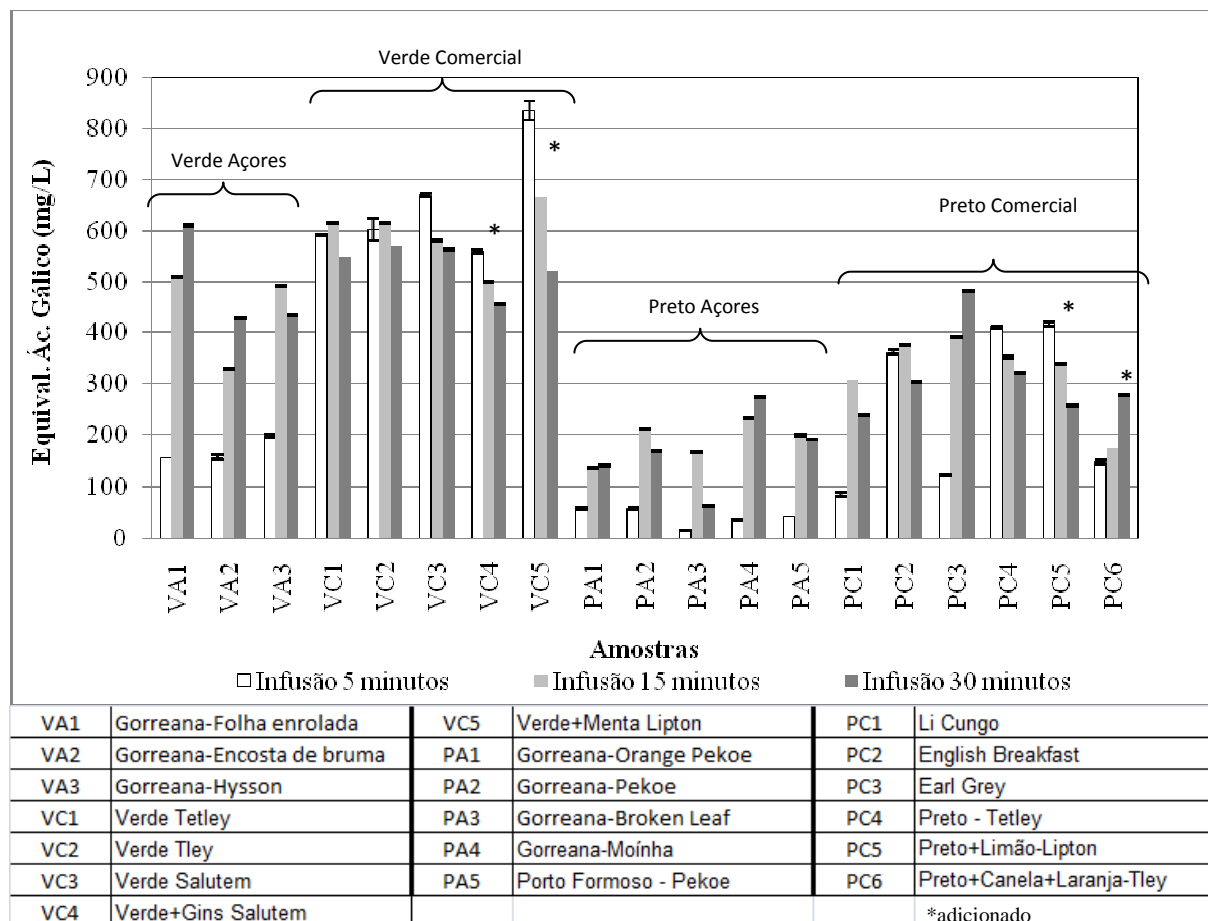


Figura 3. 11 – Capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• das amostras de infusões de 5, 15 e 30 minutos analisadas.

Nas infusões de 5 minutos, a maior actividade antiradicalar foi determinada para o chá verde comercial adicionado com menta (VC5) com um teor de $835,62 \pm 19,05$ mg GAE/L de infusão, enquanto a menor se obteve para o chá preto Gorreana Broken Leaf (PA3) com um teor $14,77 \pm 0,50$ mg GAE/L de infusão. Estes teores são significativamente superior e inferior aos restantes chás analisados, respectivamente.

O valor da actividade antiradicalar do chá verde com adição de menta (VC5) é notoriamente superior a todas as restantes amostras apesar de tal não ter ocorrido com o teor de fenólicos do mesmo chá; assim esta infusão poderá conter compostos antiradicalares não fenólicos e a menta poderá ser uma fonte suplementar destes componentes.

A actividade antiradicalar das infusões de 15 minutos variou entre $665,13 \pm 0,33$ mg GAE/L de infusão para o chá verde comercial com menta (VC5) e $136,67 \pm 0,74$ mg GAE/L de infusão para o chá preto Gorreana Orange Pekoe (PA1).

Após 30 min de infusão o chá com maior actividade antiradicalar é o chá verde Gorreana – Folha Enrolada (VA1) com o teor de $610,42 \pm 1,99$ mg GAE/L de infusão, enquanto a menor actividade foi verificada no chá preto Gorreana preto, Broken Leaf (PA3) com um teor de $61,46 \pm 1,74$ mg/L de infusão. Os valores máximos e mínimos das actividades antiradicalares das infusões de 15 min e 30 min foram também significativamente superiores e inferiores aos restantes valores obtidos.

Conclusões semelhantes a estas foram retiradas por Komes e colaboradores que avaliaram a actividade antioxidante de chá verde actividade antioxidante concluíram que esta varia com a granulometria do chá e com o tempo de infusão. Neste estudo observou-se também um aumento da actividade de

sequestração do DPPH• entre os 0 e 15 min seguido de uma diminuição entre os 15 min e os 30 min, no caso do chá em pó e em saco enquanto para o chá em folhas estes valores são sempre crescentes ao longo do tempo (Komes *et al.*, 2010).

Tal como no caso do teor de fenólicos, verifica-se que os chás pretos apresentam uma menor actividade antiradicalar que os correspondentes chás verdes e o mesmo se verifica para as médias calculadas para cada um destes grupos (Tabela 3.13).

Dentre os chás analisados, os chás verdes dos Açores apresentam uma média da capacidade antioxidante inferior aos restantes chás verdes (comerciais) apresentando os teores de $169,76 \pm 21,52$ mg GAE/L de infusão, de $443,32 \pm 89,28$ mg GAE/L de infusão e de $490,91 \pm 92,60$ mg GAE/L de infusão para as infusões de 5, de 15 e de 30 minutos, respectivamente. O mesmo se verifica para os chás pretos dos Açores ao quais apresentam uma média da capacidade antioxidante inferior aos restantes chás pretos (comerciais) apresentando os teores de $42,10 \pm 17,38$ mg GAE/L de infusão, de $188,81 \pm 35,69$ mg GAE/L de infusão e de $166,16 \pm 72,13$ mg GAE/L de infusão para as infusões de 5, de 15 e de 30 minutos, respectivamente.

Tabela 3. 13 – Médias, desvios-padrão da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• dos diferentes tipos de infusões de 5, 15 e 30 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| DPPH• (mg/L) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 169,76 ^{abc} | 621,04 ^{hi} | 697,54 ⁱ | 42,10 ^a | 244,69 ^{bcd} | 282,78 ^{bcde} | 290,65 |
| Desvio Padrão | 21,52 | 39,34 | 159,83 | 17,38 | 152,95 | 155,65 | 252,85 |
| Coeficiente de Variação (%) | 12,68 | 6,34 | 22,91 | 41,29 | 62,51 | 55,04 | 87,00 |
| DPPH• (mg/L) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 443,32 ^{efg} | 602,89 ^{ghi} | 582,30 ^{ghi} | 188,81 ^{abcd} | 356,22 ^{def} | 256,05 ^{bcd} | 378,12 |
| Desvio Padrão | 89,28 | 17,38 | 95,64 | 35,69 | 34,39 | 95,85 | 167,11 |
| Coeficiente de Variação (%) | 20,14 | 2,88 | 16,43 | 18,90 | 9,65 | 37,43 | 44,20 |
| DPPH• (mg/L) – Infusões 30 minutos | | | | | | | |
| Média | 490,91 ^{fgh} | 560,13 ^{ghi} | 488,46 ^{fgh} | 166,16 ^{ab} | 335,51 ^{cdef} | 267,02 ^{bcd} | 359,84 |
| Desvio Padrão | 92,60 | 10,35 | 36,36 | 72,13 | 95,76 | 11,76 | 163,00 |
| Coeficiente de Variação (%) | 18,86 | 1,85 | 7,44 | 43,41 | 28,54 | 4,40 | 45,30 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Verifica-se, que para os chás dos Açores e para os chás pretos comerciais a capacidade antiradicalar média aumentou ao longo do tempo de infusão independentemente das variações individuais de cada chá; alguns coeficientes de variação muito elevados aos 5 min, o que denotava a grande heterogeneidade da actividade antiradicalar desse grupo de amostras, foram diminuindo à medida que o tempo de infusão aumentou.

A comparação dos 6 grupos de infusões considerados (Tabela 3.13) revelaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$):

- Nas infusões de 5 minutos, os chás verdes comerciais (simples e adicionados) apresentam capacidades antiradicalares médias significativamente superiores a todos os outros grupos de chás analisados. O chá preto dos Açores apresenta um valor significativamente inferior a todos os chás pretos comerciais (simples e adicionados).
- Nas infusões de 15 minutos, os chás verdes comerciais (simples e adicionados) continuam a apresentar capacidade antiradicalar média significativamente superior a todos os outros grupos de chás analisados. Os chás pretos dos Açores apresentam uma capacidade significativamente inferior a todos os chás verdes dos Açores. Verifica-se ainda que todos os chás verdes, com excepção do chá verde Gorreana – Encosta da Bruma (VA2), apresentam uma capacidade antioxidante significativamente superior a todos os chás pretos.
- Nas infusões de 30 minutos, os chás verdes comerciais (simples e adicionados) apresentam uma capacidade antioxidante média significativamente superior à capacidade de todos os chás pretos analisados. Os chás verdes dos Açores apresentam uma capacidade intermédia. Verifica-se ainda que todos os chás pretos, com excepção do chá preto comercial Earl Grey (PC3), têm valores significativamente inferiores a todos os chás verdes.

Comparando as infusões considerando os diferentes grupos para os diferentes tempos de infusão, verificamos que cada um dos grupos não apresenta diferenças significativas entre os 5 min, 15 min e 30 min, à excepção dos chás verdes dos Açores entre os 5 min e 15 min.

Comparando a actividade de sequestração do radical DPPH dos chás verdes e pretos com a mesma actividade dos chás vermelhos e tisanas (figura 3.12) verifica-se que o chá vermelho – Erva Pura (V4) é o que apresenta uma capacidade antioxidante inferior a todos os outros chás e tisanas ($19,59 \pm 0,60$ mg GAE/L). Este chá já tinha apresentado o menor teor de fenólicos no grupo dos chás vermelhos mas apresentou concentrações destes compostos superiores às encontradas nas tisanas. No caso da actividade antiradicalar as tisanas apresentam valores mais elevados do que a maior parte dos chás vermelhos o que evidencia a dissolução de compostos não fenólicos com esta propriedade.

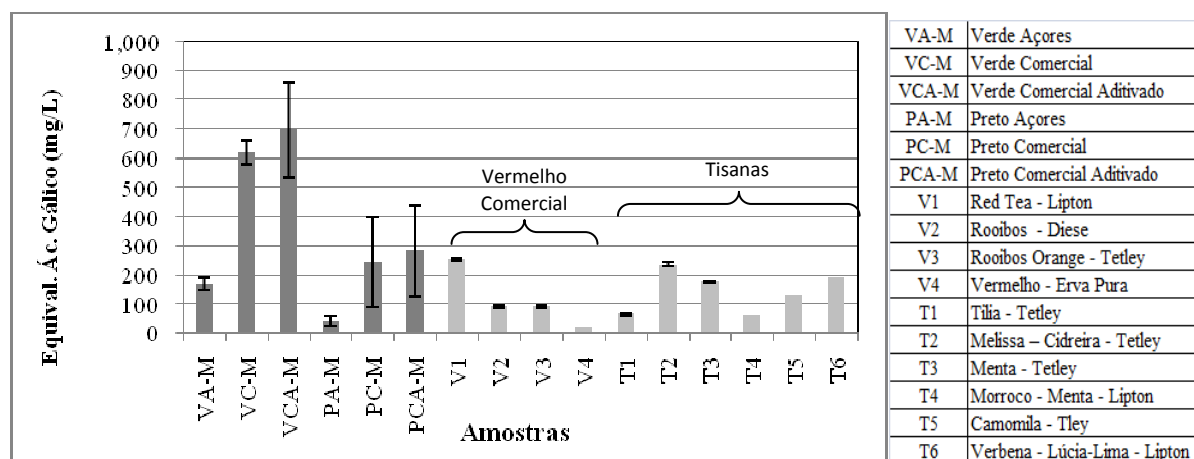


Figura 3. 12 – Capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• das amostras de infusões de 5 minutos analisadas.

No entanto, comparando as médias dos grupos de chás considerados (tabela 3.14), verificamos que é o grupo dos chás pretos dos Açores que apresenta uma menor capacidade antioxidante. Este grupo apresenta uma capacidade significativamente inferior a todos os chás comerciais (verdes e pretos).

Os chás verdes dos Açores, os chás pretos comerciais, os chás vermelhos e tisanas, não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Os chás verdes comerciais são significativamente superiores aos restantes grupos de chás e tisanas sendo os chás adicionados o que apresenta maior capacidade antioxidante

Tabela 3. 14 – Médias, desvios-padrão da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• das infusões de 5 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| DPPH• (mg/L) – Infusões 5 minutos | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Chá Vermelho Comercial (n=4) | Tisanas (n=4) | Total |
| Média | 169,76 ^{abc} | 621,04 ^d | 697,54 ^d | 42,10 ^a | 244,69 ^{bc} | 282,78 ^c | 113,61 ^{ab} | 143,07 ^{abc} | 235,69 |
| Desvio Padrão | 21,52 | 39,34 | 159,83 | 17,38 | 152,95 | 155,65 | 91,53 | 68,23 | 222,13 |
| Coefficiente de Variação (%) | 12,68 | 6,34 | 22,91 | 41,29 | 62,51 | 55,04 | 80,56 | 47,69 | 94,24 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Um estudo realizado por Gadow e sua equipa determinou que os diferentes tipos de chá têm diferentes actividades de neutralização do radical DPPH• podendo ser organizadas pela seguinte ordem: Chá verde > Rooibos > Chá preto (Gadow *et al.*, 1997).

Horzic e colaboradores apresentaram resultados comparáveis de actividade antiradicalar para chás verdes e pretos (Horzic *et al.*, 2009). Conclusões idênticas foram encontradas por Moraes-de-Souza e colaboradores (Moraes-de-Souza *et al.*, 2008) enquanto outros autores demonstraram que a actividade radicalar dos chás verdes é superior à dos chás pretos, com valores de $82,54 \pm 0,46$ e $66,65 \pm 1,55$ mg equivalentes de ácido ascórbico (AAE)/ g de chá respectivamente (Oh *et al.*, 2013).

Os mesmos autores obtiveram os valores mais baixos de actividade antiradicalar para o chá Rooibos ($9,06 \pm 0,35$ mg AAE/g), enquanto o chá de hortelã-pimenta (uma infusão) apresentou um valor de $29,73 \pm 0,20$ mg AAE/g com teor intermédio ao chá preto e o chá Rooibos (Oh *et al.*, 2013).

Também no caso das tisanas se encontram diferentes avaliações da actividade antiradicalar com valores inferiores aos de chás pretos e verdes para alguns autores (Horzic *et al.*, 2009) enquanto outros atribuem uma actividade antiradical de 82,5% a infusão de camomila e de 78% e 77%, respectivamente, para esta mesma actividade em chá verde e preto (Moraes-de-Souza *et al.*, 2008). Estas diferenças podem resultar de variações nas formulações utilizadas pelos diferentes autores bem como de diferenças na natureza e proveniência do chá.

A diminuição da actividade antioxidante determinada pelo método de DPPH• com a idade das folhas, (Chan *et al.*, 2007) e o seu aumento com o grau de moagem (Komes *et al.*, 2010) são também factores de variabilidade que justificam as diferentes conclusões encontradas na literatura em comparações de diferentes tipos de chá.

3.3.2.2.2 - Redutora férrica (FRAP)

A actividade antioxidante dos chás e infusões foram ainda avaliados através do teste da actividade de redução férrica (FRAP) e os resultados obtidos para chás pretos e verdes apresentam-se na (figura 3.13).

Os resultados referentes ao poder redutor apresentam perfis de variação entre chás e ao longo do tempo de infusão que são distintos dos observados para o teor de compostos fenólicos e para a actividade de sequestração do radical DPPH o que indica que apesar de poderem apresentar correlações fortes ou muito fortes, estes três testes fornecem informações complementares sobre a actividade antioxidante das amostras e respondem especificamente a alguns componentes das amostras.

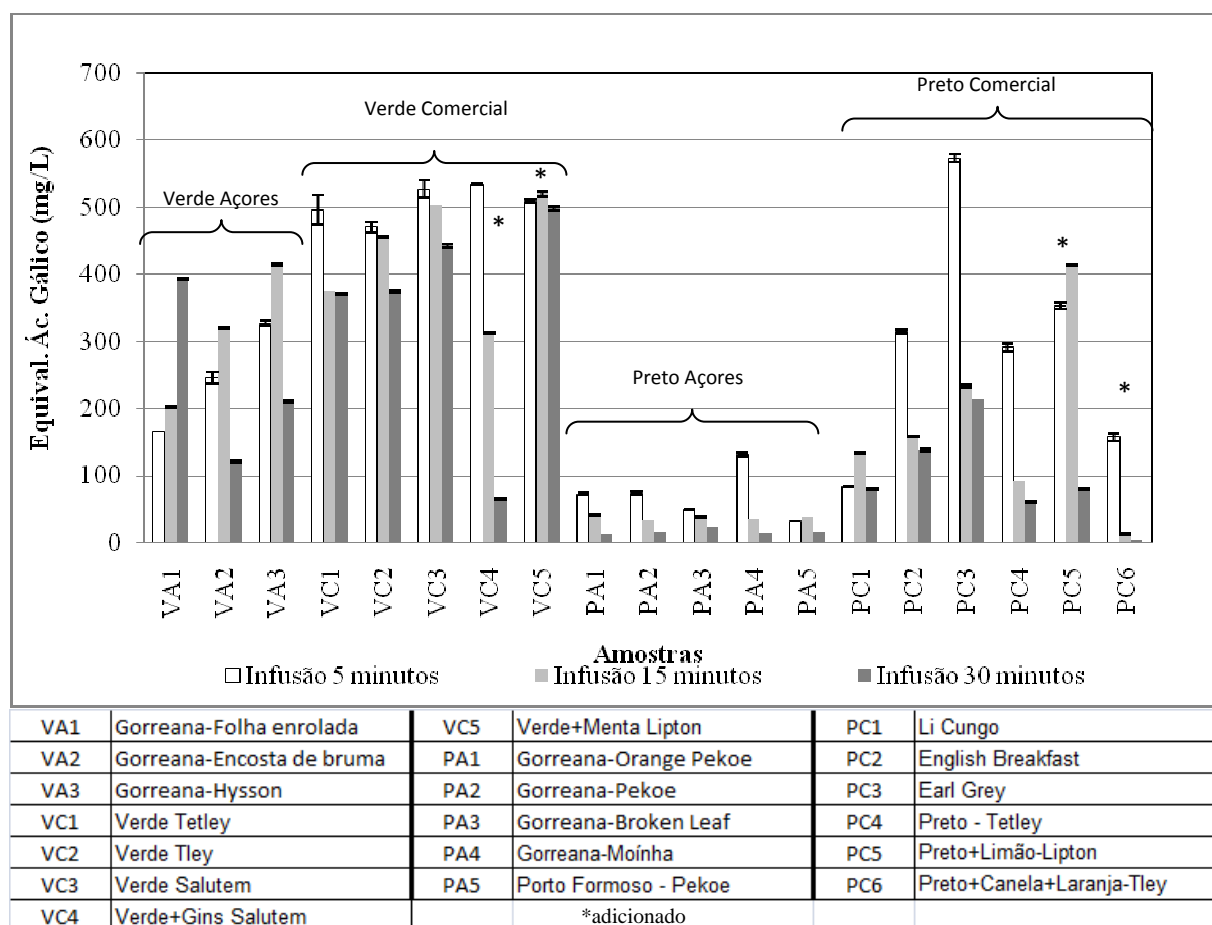


Figura 3. 13 – Poder redutor férrico (FRAP) das infusões de 5, 15 e 30 minutos analisadas.

A diferença entre chás verdes e chás pretos bem como as diferenças entre chás dos Açores parecem ser mais acentuadas no caso do poder redutor do que para os outros dois testes efectuados. Por outro lado, para a maior parte dos chás pretos (dos Açores e comerciais) bem como para os chás verdes comerciais o poder redutor aos 5 min atingiu o valor máximo e o aumento do tempo de infusão apenas contribuiu para estabilizar ou reduzir esta propriedade. Para algumas amostras como o chá verde VC4 (verde ginseng) e a maior parte dos chás pretos (dos Açores e comerciais) observaram-se mesmo reduções superiores a 50% do poder redutor quando o tempo de infusão variou entre 5 min e 30 min, o que parece indicar uma particularidade susceptibilidade dos componentes do chá responsáveis pelo poder redutor às condições de temperatura e exposição à luz solar durante o processo de infusão. Esta redução acentuada do poder redutor poderá significar que os componentes com esta actividade são

primeiro rapidamente extraídos mas a sua concentração na infusão baixa rapidamente devido a processos de polimerização ou degradação.

Nas infusões de 5 minutos, o poder redutor férrico do chá preto comercial Earl-Grey (PC3) foi de $572,70 \pm 5,94$ mg GAE/L de infusão um valor significativamente superior às restantes infusões, enquanto o poder redutor mais baixo foi registado para o chá preto dos Açores – Porto Formoso - Pekoe (PA5) com um valor de $32,85 \pm 0,70$ mg GAE/L de infusão, significativamente inferior a todas as outras infusões de 5 minutos excepto o chá preto dos Açores Gorreana Broken Leaf (PA3), que também apresentou um poder redutor baixo.

Nas infusões de 15 e 30 minutos, o maior poder redutor verificado, foi em ambos os casos o do chá verde comercial com menta (VC5) com um valor de $520,12 \pm 3,69$ mg GAE/L de infusão e de $497,54 \pm 2,29$ mg GAE/L de infusão, respectivamente. Já no caso da actividade antiradicalar se tinha constatado que este chá se destacava relativamente aos restantes chás verdes comerciais o que não aconteceu com o teor de compostos fenólicos totais; assim podemos colocar a hipótese de que compostos antioxidantes de natureza não fenólica ou pelo menos não reactivos no teste de Folin-Ciocalteu podem estar a ser cedidos à infusão pela folha de menta e contribuem para elevar o poder antiradicalar e redutor deste chá.

O poder redutor do chá preto com laranja e canela (PC6) foi significativamente mais baixo que o das restantes infusões preparadas com tempos de contacto de 15 min e 30 min apresentando valores de $12,96 \pm 0,26$ e de $3,86 \pm 0,99$ mg/L de infusão respectivamente. A variação do poder redutor do chá com o tempo de infusão foi também abordada num estudo realizado por Komes e colaboradores e no qual foi determinado o poder redutor de infusões de chás com diferentes granulometrias (folhas de chá, chá em saco e chá em pó) e tempos de infusão entre 5 min e 30 min. Estes autores verificaram que o poder redutor FRAP do chá com menor granulometria (em pó e em saco) é máximo aos 5 minutos e decresce até aos 30 minutos enquanto para o chá em folhas, o poder redutor aumenta dos 5 para os 15 minutos mas decresce a seguir até aos 30 minutos (Komes *et al.*, 2010). Estes resultados estão de acordo com a hipótese formulada de que os compostos mais facilmente extraídos das folhas de chá são também os mais susceptíveis de sofrer reacções de degradação e polimerização. Já os compostos que são extraídos gradualmente só atingem concentrações mais elevadas após 15 min ou 30 min de infusão quando a temperatura da água já baixou o que pode reduzir a velocidade de determinadas reacções e contribuir para que os compostos se mantenham em solução na sua estrutura original.

Outro estudo do poder redutor de chá verde, mostrou que quando o chá foi preparado a 80°C, o seu poder redutor aumentou ao longo do tempo de infusão independentemente de serem folhas soltas ou em chá em saco. (Rusak *et al.*, 2008)

Analisando as médias do poder redutor férrico (FRAP) de todos os chás analisados para cada tempo de infusão, verifica-se que este poder varia inversamente em relação ao tempo de infusão, ou seja, vai diminuindo à medida que o tempo de infusão aumenta (tabela 3.15). Esta situação verifica-se também para cada um dos grupos considerados, exceptuando-se para os chás verdes dos Açores entre os 5 e os 15 minutos.

Tabela 3. 15 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP) dos diferentes tipos de infusões de 5, 15 e 30 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| FRAP (mg/L) – Infusões 5 minutos | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Total |
| Média | 245,74 ^{cdefg} | 497,46 ^{hi} | 522,06 ⁱ | 72,09 ^{abcd} | 315,62 ^{efghi} | 255,25 ^{defg} | 284,58 |
| Desvio Padrão | 72,23 | 28,04 | 14,17 | 35,24 | 185,49 | 112,69 | 186,72 |
| Coeficiente de Variação (%) | 29,39 | 5,64 | 2,71 | 48,89 | 58,77 | 44,15 | 65,61 |
| FRAP (mg/L) – Infusões 15 minutos | | | | | | | |
| Média | 312,08 ^{efgh} | 443,47 ^{ghi} | 416,35 ^{fghi} | 37,06 ^{ab} | 154,44 ^{abcde} | 213,41 ^{abcdef} | 227,85 |
| Desvio Padrão | 95,66 | 57,96 | 119,84 | 3,53 | 55,10 | 231,46 | 177,01 |
| Coeficiente de Variação (%) | 30,65 | 13,07 | 28,78 | 9,52 | 35,68 | 108,46 | 77,69 |
| FRAP (mg/L) – Infusões 30 minutos | | | | | | | |
| Média | 241,23 ^{bcdefg} | 395,89 ^{fghi} | 281,36 ^{efg} | 15,69 ^a | 123,31 ^{abcde} | 41,85 ^{abc} | 164,71 |
| Desvio Padrão | 124,21 | 36,20 | 249,63 | 4,48 | 63,81 | 43,87 | 165,34 |
| Coeficiente de Variação (%) | 51,49 | 9,14 | 88,72 | 28,58 | 51,75 | 104,83 | 100,38 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Analisando os valores médios do poder redutor férrico das infusões, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá (tabela 3.15), verifica-se que, para as infusões de 5 minutos, os chás dos Açores verdes e pretos, foram aqueles que apresentaram menor teor médio, de $245,74 \pm 72,23$ mg GAE/L de infusão e de $72,09 \pm 35,24$ mg GAE/L de infusão, respectivamente. O poder redutor do chá preto dos Açores foi significativamente inferior a todos os chás comerciais, com exceção dos chás pretos adicionados. Os chás verdes comerciais (simples e adicionados) apresentaram teores significativamente superiores aos outros grupos considerados, com exceção dos chás pretos comerciais.

Para as infusões de 15 min verifica-se que os chás pretos têm valores médios de poder redutor inferiores aos chás verdes, sendo que, os chás pretos comerciais (simples e adicionado) e o chá verde dos Açores apresentam teores intermédios entre o chá preto dos Açores e os chás verdes comerciais (simples e adicionado), sendo estes últimos significativamente superiores a todos os chás pretos. Nas infusões de 30 min, apesar de os teores médios terem sido inferiores aos obtidos aos 15 min, continuou a verificar-se que os chás pretos apresentaram valores médios de poder redutor inferiores aos chás verdes, e significativamente inferiores aos chás verdes comerciais simples.

Comparando o poder redutor dos chás verdes e pretos com o dos chás vermelhos e tisanas (figura 3.14) verifica-se que os chás vermelhos apresentam valores desta actividade inferiores aos dos chás pretos comerciais sendo o valor mais baixo obtido para o chá vermelho – Erva Pura (V4) é o que apresenta um poder redutor inferior a todos os outros chás ($19,40 \pm 0,57$ mg GAE/L), valor este que é significativamente inferior a todos os chás analisados, com excepção do chá preto dos Açores Porto Formoso (PA5).

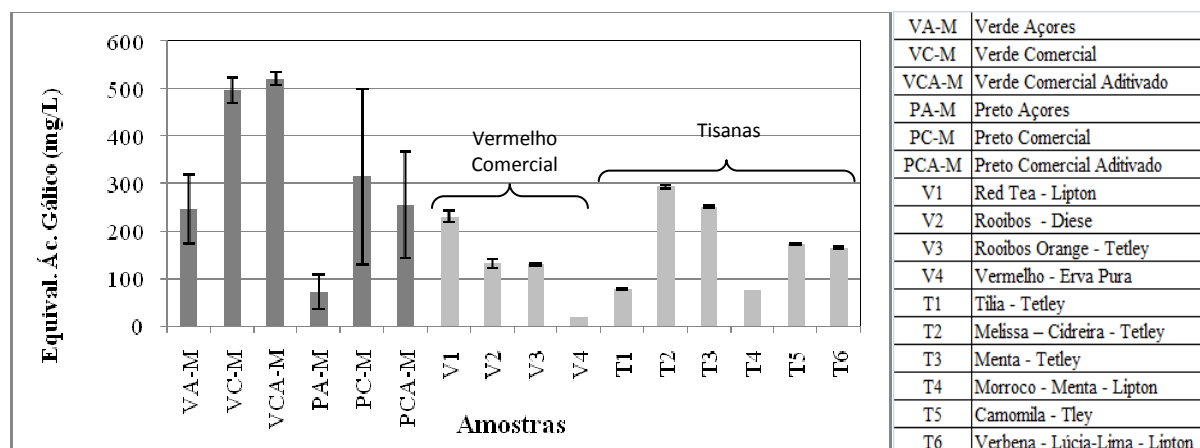


Figura 3. 14 – Poder redutor férrico (FRAP) das infusões de 5 minutos analisadas.

As tisanas apresentam actividade redutora variável segundo a sua natureza, compreendendo amostras como a cidreira (T2) e a menta (Tetley, T3) com poder redutor comparável aos chás pretos comerciais e amostras como a Menta – Morroco – Lipton (T4) ou tília (T1) com valores inferiores a alguns chás vermelhos.

O grupo de chás pretos do Açores apresenta um poder antioxidante significativamente inferior aos chás verdes dos Açores e aos chás comerciais (tabela 3.16). Os chás verdes comerciais (simples e adicionado) são os que apresentam o poder redutor significativamente superior ($p < 0,05$).

Tabela 3. 16 – Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante de redução férrica (FRAP) dos diferentes tipos de infusões de 5 minutos, agrupadas de acordo com a origem geográfica das folhas de chá, constituição e processo de produção.

| FRAP (mg/L) – Infusões 5 minutos | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------|
| | Chá verde de Açores (n=3) | Chá verde Comercial (n=3) | Chá verde Comercial adicionado (n=2) | Chá preto de Açores (n=5) | Chá preto Comercial (n=4) | Chá preto Comercial adicionado (n=2) | Chá Vermelho Comercial (n=4) | Tisanas (n=4) | Total |
| Média | 245,74 ^{bc} | 497,46 ^d | 522,06 ^d | 72,09 ^a | 315,62 ^c | 255,25 ^{bc} | 128,14 ^{ab} | 172,85 ^{abc} | 239,89 |
| Desvio Padrão | 72,23 | 28,04 | 14,17 | 35,24 | 185,49 | 112,69 | 80,28 | 84,34 | 169,78 |
| Coeficiente de Variação (%) | 29,39 | 5,64 | 2,71 | 48,89 | 58,77 | 44,15 | 62,65 | 48,80 | 70,78 |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

O poder redutor férrico (FRAP) varia com a idade das folhas. Esta observação foi efectuada por Chan e sua equipa que verificou que o poder redutor variava de $55,6 \pm 1,8$, para $54,5 \pm 2,8$ e para $21,3 \pm 3,5$ mg GAE/g consoante a infusão fosse preparada com rebentos, folhas jovens ou folhas, respectivamente

(Chan *et al.*, 2007). Este tipo de variação do poder FRAP de acordo com a idade das folhas foi também observado noutro estudo (Song *et al.*, 2012). Quanto à influência da natureza do chá no seu poder redutor Oh e colaboradores obtiveram os valores mais elevados desta propriedade para o chá verde seguindo-se o chá preto, o chá Rooibos e por último o chá de hortelã-pimenta, com valores de $1,01 \pm 0,02$, $0,90 \pm 0,03$, $0,78 \pm 0,03$ e $0,54 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Oh *et al.*, 2013). Outro estudo apresenta o chá verde com o poder redutor mais elevado (143 ± 11 e 84 ± 11 mg GAE/g), seguido do chá preto ($53 \pm 3,0$ e $36 \pm 3,0$ mg GAE/g), chá de hortelã-pimenta ($37 \pm 0,3$ mg GAE/g), chá de menta ($31 \pm 0,4$ mg GAE/g), chá Rooibos ($20 \pm 0,4$ mg GAE/g) e por fim chá de camomila ($8,1 \pm 0,2$ mg GAE/g), (Chan *et al.*, 2010). Também no presente trabalho os dois chás de menta T3 e T4 apresentaram valores de poder redutor muito distintos indicando que as propriedades antioxidantes desta tisana podem variar muito em função da forma de preparação.

Um estudo realizado apenas com tisanas (Katalinic & Jukic, 2006) mas com 30 minutos de infusão mostra que aquela que apresenta maior poder redutor férrico (FRAP) é a infusão de cidreira, seguida da de menta, de tília, de camomila e por fim a de verbena-lúcia-lima, com teores de 25234, 8987, 3807, 2856 e 2089 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$, respectivamente, o que está de acordo com os resultados de actividade antioxidante elevada encontrados no presente trabalho para as tisanas de cidreira e de menta.

Considerando este conjunto de amostras de chás e tisana avaliaram-se as correlações binárias entre cada um dos três testes realizados (Folin-Ciocalteu, DPPH[•] e FRAP) e o tempo de infusão através da determinação do coeficiente de correlação de Pearson e encontraram-se correlações fortes ou muito fortes o que evidencia a influência do parâmetro tempo de infusão nas propriedades antioxidantes dos chás.

3.3.2.3 – Efeito da moagem da folha na actividade biológica de infusões de 15 e 30 minutos em chás verdes dos Açores

Uma vez que os chás dos Açores (verdes e pretos) se apresentam sob a forma de folhas, com excepção do chá preto Gorreana Moinha (PA4) enquanto os chás comerciais se apresentam granulados ou em pó, e que estas granulometrias distintas foram sugeridas como possíveis causas das diferenças encontradas na actividade antioxidante e teor de compostos fenólicos pretendeu-se testar esta hipótese avaliando o efeito da moagem na actividade antioxidante dos chás verdes dos Açores.

Assim efetuou-se a moagem das folhas de chá verde dos Açores e avaliou-se o o efeito desta operação no teor de fenólicos totais e na capacidade antioxidante (método de DPPH[•] e método FRAP). Os tempos de infusão seleccionados para este teste foram os 15 min e os 30 min pois os ensaios anteriores demonstraram que após 5 min de infusão a dissolução dos componentes fenólicos destes chás se encontra ainda muito distante do equilíbrio.

3.3.2.3.1 – Fenólicos totais

Verifica-se que a moagem das folhas de chá verde permitiu observar um aumento da extracção dos fenólicos totais das folhas de chá, possivelmente devido ao aumento da superfície de contacto entre o chá e o solvente, neste caso a água fervente. Esta operação pode até alterar a ordenação dos chás por ordem crescente de actividade antioxidante: o chá Gorreana Hysson que na forma original apresentava valores de actividade antioxidante próximos mas inferiores aos do chá Gorreana – Folha Enrolada passa a ser o chá com actividade antioxidante mais elevada após ser submetido à operação de moagem.

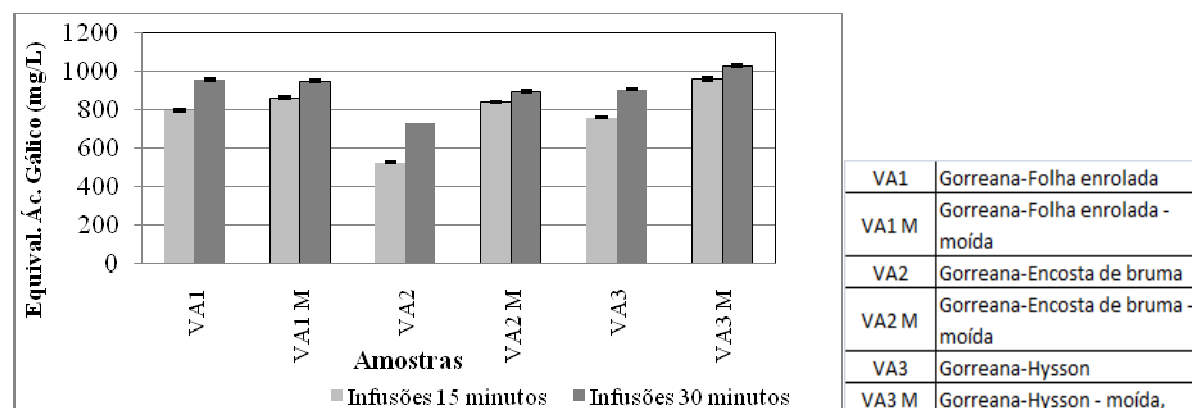


Figura 3. 15 – Teor de fenólicos totais de infusões de 15 e 30 minutos de chá verde dos Açores

Para o mesmo chá, verifica-se que os teores de fenólicos totais nas infusões, independentemente dos tempos de 15 ou 30 minutos, são significativamente diferentes quando se prepara o chá a partir da folha inteira ou da folha moída, com excepção do chá Gorreana - Folha enrolada de 30 minutos para o qual não se observam essas diferenças.

Costa e colaboradores demonstraram que, os teores de fenólicos totais de chá verde, preparado a partir de folhas soltas ou de saco de chá são diferentes, sendo o valor mais elevado obtido para o chá moído, tal como observado no presente estudo. (Costa *et al.*, 2012).

Esta observação é no entanto contrariada por outro estudo (Nishiyama *et al.*, 2010) em que se verifica que o teor de fenólicos totais em solução é reduzido com o uso de chá em saco (contendo chá moído). A razão para que haja esta diferença é possivelmente o facto de neste estudo o saco ter sido usado como é disponibilizado no mercado e nos estudos anteriores o saco é aberto e foi utilizada a mesma quantidade de chá, independentemente da apresentação comercial.

3.3.2.3.2 - Actividade antioxidante

3.3.2.3.2.1 - Antiradicalar (DPPH')

Aqui, tal como já havia sido verificado na determinação do teor de fenólicos, a moagem das folhas de chá verde provocou um aumento da capacidade de sequestração do radical DPPH' nos chás com o mesmo tempo de infusão. Este facto deve-se possivelmente, como já referido ao aumento da superfície de contacto entre o chá e o solvente, neste caso a água fervente.

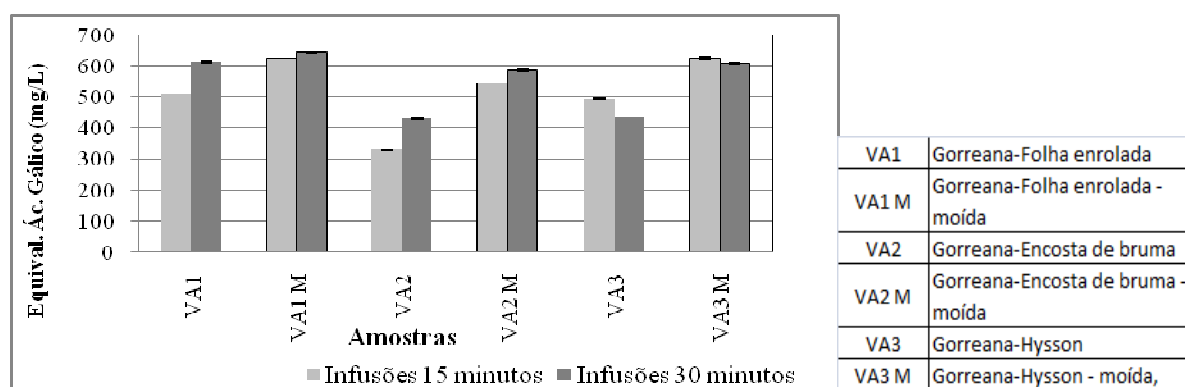


Figura 3. 16 – Capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 15 e 30 minutos de chá verde dos Açores

Para o mesmo chá, verifica-se que a capacidade antioxidante das infusões, independentemente dos tempos de 15 ou 30 minutos, é significativamente diferentes quando se prepara o chá a partir da folha inteira ou da folha moída.

Verifica-se também que o aumento da capacidade antiradicalar foi mais pronunciado nas amostras com valores mais baixos desta propriedade para o chá em folha enquanto o chá VA1 (Gorreana – Folha Enrolada) não apresentou um acréscimo tão pronunciado das suas propriedades em função do processo de moagem; esta observação parece sugerir que as diferenças observadas na actividade antioxidante e teor de fenólicos dos diferentes tipos de chá verde dos Açores poderão depender muito mais de limitações à transferência dos compostos bioactivos para as infusões do que devido a diferenças intrínsecas de composição.

3.3.2.3.2.2 - Redutora férrica (FRAP)

Neste teste, a moagem das folhas de chá verde provocou as mesmas alterações no poder redutor férrico que o chá em folha (ponto 3.3.2.2.2) para os chás com o mesmo tempo de infusão, verificando-se os valores do poder redutor são mais elevados nos chás preparados a partir da folha moída.

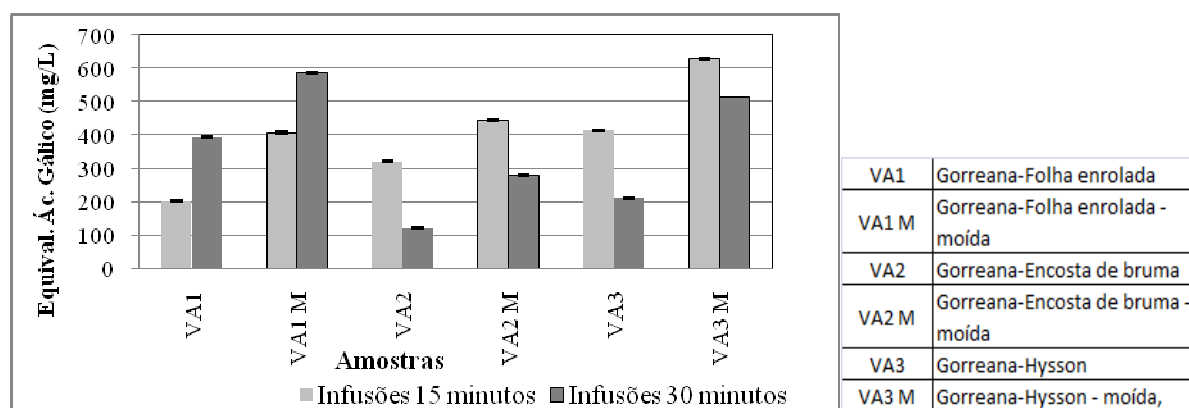


Figura 3. 17 – Poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 15 e 30 minutos de chá verde dos Açores

Para o mesmo chá, verifica-se que o poder redutor férrico das infusões, independentemente dos tempos de 15 ou 30 minutos, é significativamente diferente quando se prepara o chá a partir da folha inteira ou da folha moída.

Observa-se também que as diferenças no poder redutor entre amostras de folhas de chá antes e após a operação de moagem são mais pronunciadas do que o que se observou nos testes anteriores; este diferente comportamento do poder redutor já tinha sido referido quanto à influência do tempo de infusão, ou seja, os componentes do chá com actividade redutora parecem ser particularmente sensíveis a limitações no processo de transferência do chá para a infusão.

Um estudo (Komes *et al.*, 2010) mostra que, para um tempo de infusão de 5 minutos, o chá em pó apresentou maior poder de redução férrica ($20,4 \pm 0,64$ mmol Fe^{2+}/L), seguindo-se o chá em saco com $15,4 \pm 0,67$ mmol Fe^{2+}/L e finalmente o chá em folha, com $10,4 \pm 0,53$ mmol Fe^{2+}/L .

Esta variação não é tão evidente noutro estudo (Rusak *et al.*, 2008) em que a comparação é feita entre chá em folhas soltas e chá ensacado, mas com infusões preparadas a 80°C .

3.3.3 – Determinação de compostos fenólicos individuais em infusões e extractos aquosos de chá verde e preto

A presença de compostos fenólicos em matrizes alimentares é geralmente associada à sua actividade antioxidante ou outras actividades biológicas, mas nem sempre é conhecido o contributo de cada componente individual para a actividade global.

Os diversos compostos fenólicos tal como outros compostos bioactivos apresentam actividades individuais distintas (Chan *et al.*, 2007; Komes *et al.*, 2010; Moraes de Souza *et al.*, 2008) mesmo dentro de grupos de fenólicos com estruturas muito semelhantes.

Por exemplo, a presença do grupo catecol tem sido associada a uma actividade biológica particularmente elevada (Havsteen, 2002; Pessuto *et al.*, 2009).

Assim, além de caracterizar a actividade antioxidante, o teor de compostos fenólicos totais e a absorção em UV-VIS a comprimentos de onda característicos de determinados grupos funcionais, efectuou-se o estudo dos componentes fenólicos individuais das infusões e extractos aquosos de chás verdes e pretos de forma a identificar componentes característicos de cada chá e tentar relacionar a sua concentração com as actividades anteriormente determinadas.

Sendo o chá uma matriz relativamente simples, de base aquosa e que não contém quantidades significativas de proteínas, lípidos ou carboidratos foi possível analisar as amostras em natureza.

Um dos factores críticos para a transferência de catequinas, de ácidos fenólicos, flavonoides e cafeína das folhas de chá para as infusões ou extractos aquosos é o tempo de extracção e a razão chá:água. Efectuou-se a análise de compostos fenólicos individuais nas infusões de 15 min que correspondem a uma preparação tradicional do chá, nos extractos aquosos que podem conter compostos fenólicos do chá não extraídos em métodos mais suaves e numa série de infusões efectuadas com tempo de infusão crescente (0 min, 5 min, 15 min, 30 min e 60 min), de forma a tentar avaliar a cinética de extracção dos principais componentes fenólicos do chá.

As amostras foram analisadas em HPLC-DAD, numa coluna C18 utilizando como solventes misturas de água, ácido fórmico e acetonitrilo e um gradiente de eluição optimizado para a separação de compostos fenólicos (Bravo *et al.*, 2006). A detecção foi efectuada na gama de comprimentos de onda de 200 nm a 600 nm, com canais específicos de aquisição a 280 nm, 320 nm e 360 nm. Apesar da determinação destes compostos no chá se focar frequentemente na determinação de catequinas ao comprimento de onda de 280 nm (El-Shahawi *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012; Dou *et al.*, 2007; Carloni *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2003), onde estas moléculas apresentam o seu máximo de absorção, pretendemos estender a análise a outros comprimentos de onda específicos para outros grupos de compostos fenólicos que podem também ser extraídos das folhas de chá como é o caso dos ácidos hidroxibenzóicos, os ácidos hidroxicinâmicos, as hidroxiflavonas e os flavonoides.

Um conjunto de padrões de catequinas, ácidos hidroxibenzóicos, flavonoides e cafeína foram analisados nas mesmas condições que as amostras e as suas áreas cromatográficas permitiram o traçado de curvas de calibração no intervalo de concentrações 10 a 200 mg/L, como apresentado na tabela 3.17. Todas as curvas de calibração foram lineares nos intervalos de concentração testados com coeficientes de correlação superiores a 0,9976.

Tabela 3. 17 – Padrões utilizados, janelas de retenção, rectas de calibração, coeficientes de correlação e gamas de concentração utilizadas na calibração.

| Nome dos Padrões | Janela de Retenção | Equação da recta (Área=f(C)) | Coeficientes de Correlação | Gama de Concentração (mg/L) |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Catequinas | | | | |
| Galocatequina | 21,63-21,88 | $y = 28095x - 88087$ | $R^2 = 0,9995$ | 25 - 100 |
| (+)-Catequina | 35,19-35,66 | $y = 128090x - 818204$ | $R^2 = 0,9981$ | 25 - 100 |
| Cafeína | 36,60-36,95 | $y = 341920x + 2E+06$ | $R^2 = 0,9999$ | 25 - 100 |
| (-)-Epicatequina | 44,49-44,96 | $y = 97725x - 540483$ | $R^2 = 0,9985$ | 25 - 100 |
| (-)-Epigallocatequina-3-galato | 45,07-45,56 | $y = 176269x + 1E+06$ | $R^2 = 0,9886$ | 25 - 100 |
| (-)-Galocatequina-3-galato | 48,96-49,49 | $y = 209901x + 29254$ | $R^2 = 0,9989$ | 25 - 100 |
| (-)-Epicatequina-3-gallate | 55,50-56,08 | $y = 240559x + 768909$ | $R^2 = 0,9989$ | 25 - 100 |
| (-)-Catequina-3-galato | 57,24-57,84 | $y = 262845x + 395983$ | $R^2 = 0,9996$ | 25 - 100 |
| Procianidina B2 | 40,89-41,19 | $y = 93557x - 130182$ | $R^2 = 0,9999$ | 12,5 - 200 |
| Ácidos Benzóicos | | | | |
| Ác. Gálico | 15,67-16,35 | $y = 396915x + 308281$ | $R^2 = 0,9994$ | 10 - 100 |
| Ác. 3,4-Dihidroxibenzóico | 22,03-22,92 | $y = 249900x + 113434$ | $R^2 = 0,9998$ | 10 - 100 |
| Ác. Clorogénico | 38,04-39,30 | $y = 231854x - 388759$ | $R^2 = 0,9976$ | 10 - 100 |
| Ác. Cafeico | 40,83-42,48 | $y = 496732x + 245947$ | $R^2 = 0,9997$ | 10 - 100 |
| Ác. Coumárico | 50,69-52,26 | $y = 771453x + 492834$ | $R^2 = 0,9996$ | 10 - 100 |
| Ác. Ferúlico | 54,56-55,78 | $y = 440873x + 90858$ | $R^2 = 0,9993$ | 10 - 100 |
| Flavonoides | | | | |
| Isoquercitrina | 59,38-59,51 | $y = 197053x - 68553$ | $R^2 = 0,9999$ | 12,5 - 200 |
| Hidrato de quercitrina | 64,5-64,62 | $y = 271876x - 88021$ | $R^2 = 1$ | 12,5 - 200 |
| Quercetina | 78,7-78,92 | $y = 302594x - 568845$ | $R^2 = 1$ | 12,5 - 200 |

3.3.3.1 - Compostos fenólicos presentes em diferentes chás preparados com um tempo de infusão de 15 min

As infusões de 15 minutos, quer de chás verdes, quer de chás pretos foram analisadas a três comprimentos de onda específicos 280 nm, 320 nm e 360 nm com o objectivo de detectar selectivamente catequinas, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonas e outros flavonoides.

3.3.3.1.1 - Chás Verdes

A identificação dos compostos detectados aos vários comprimentos de onda nas infusões de chá verde foi feita com base nos tempos de retenção e nos espectros de absorvância dos compostos separados e por comparação destes resultados com idêntica informação obtida com padrões autênticos analisados em condições e com resultados análogos encontrados na literatura.

- Análise a 280 nm

Começamos por apresentar os resultados referentes a 280 nm, onde identificamos as catequinas e os ácidos hidroxibenzoicos existentes nas amostras analisadas.

A Figura 3.18 ilustra os perfis cromatográficos em HPLC ao comprimento de onda de 280 nm de dois chás verdes, nomeadamente, o chá Encosta da Bruma (Gorreana) e o chá verde comercial, o chá Salutem.

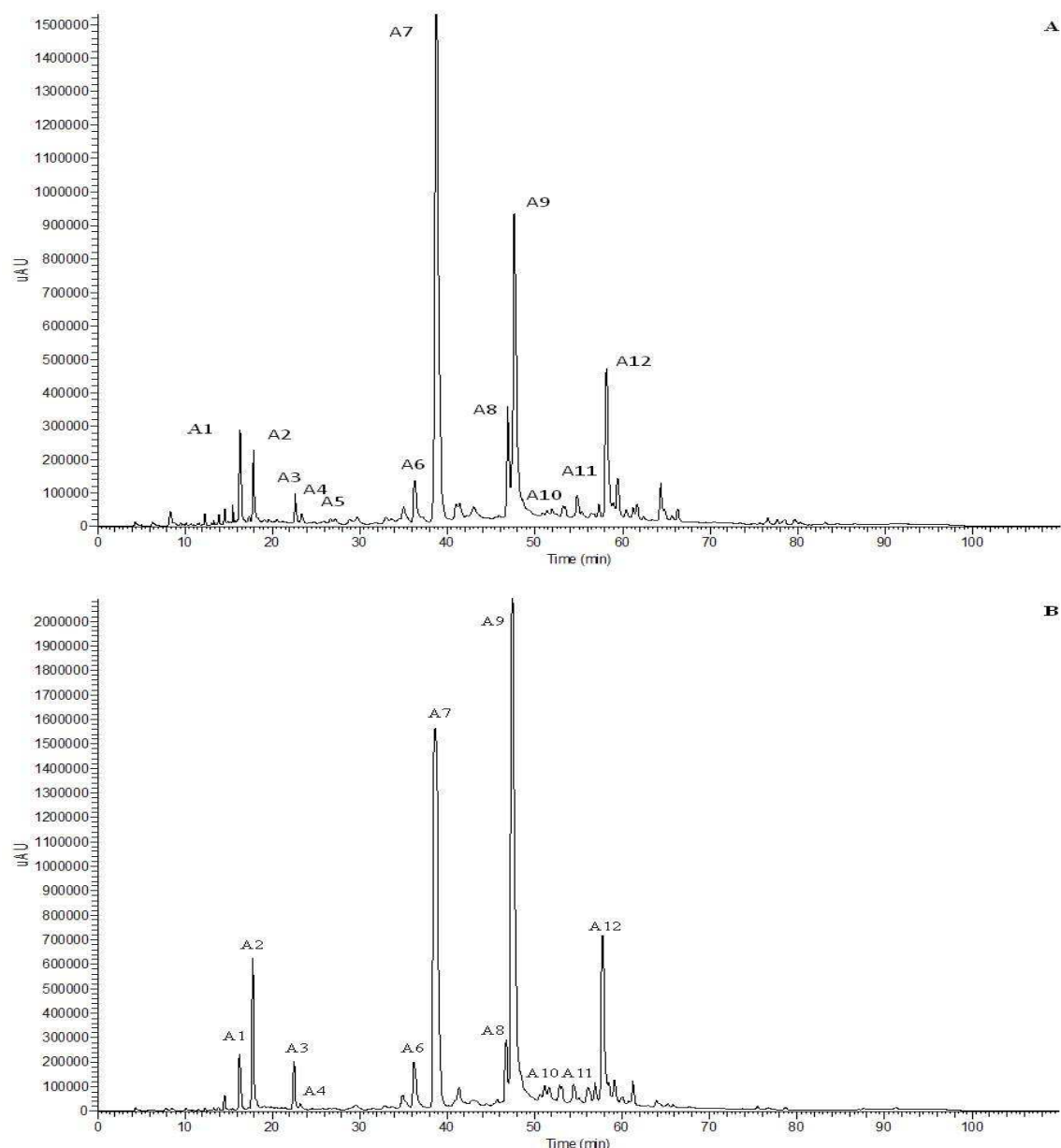


Figura 3. 18 – Cromatogramas de HPLC do chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) (A) e do chá comercial Verde Salutem (B) a 280 nm. Picos são: A1 - Ácido gálico; A2 - Ácido 5-galoilquinico; A3 – Teobromina; A4 – Galocatequina; A5 – Epigalocatequina; A6 - isómero da galocatequina 1; A7 - Cafeína + Composto fenólico desconhecido; A8 – Epicatequina; A9 - EGCG + Isómero Ácido Cumárico; A10 - Galocatequina-3-galato; A11 - Composto Desconhecido 1; A12 - Epicatequina-3-galato.

Os três picos dominantes do perfil dos chás verdes foram a cafeína e epigalocatequina – 3- galato e a epicatequina – 3-galato como é típico deste tipo de chás. Encontraram-se também outros compostos

fenólicos, com máximo de absorvância a 280 nm, nomeadamente ácidos hidroxibenzoicos, outras catequinas e outras metilxantinas.

Os compostos identificados a 280 nm são listados na tabela 3.18, indicando simultaneamente as suas janelas de retenção e as gamas de concentração em mg/L calculadas a partir de rectas de calibração relativas aos padrões correspondentes ou a um composto fenólico da mesma família.

Tabela 3. 18 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 280 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|------|--|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Ácidos hidroxibenzoicos | | | |
| A1 | Ácido gálico* | 16,21-16,53 | 6,10 – 13,12 | 239, 271 |
| A2 | Ácido 5-galoilquinico | 17,73-18,02 | 6,13 – 33,01 | 240, 274 |
| | Catequinas | | | |
| A4 | Galocatequina* | 23,19-23,68 | 19,82 – 36,24 | 242, 270 |
| A5 | Epigalocatequina | 26,53-27,27 | 6,50 – 11,18 | 242, 273 |
| A6 | Isómero da galocatequina 1 | 35,85-36,95 | 25,71 – 48,29 | 242, 270 |
| A8 | Epicatequina* | 46,21-47,02 | 41,52 – 63,55 | 242, 279 |
| A9 | Epigalocatequina-3-galato* + Ácido Cumárico* | 47,02-47,87 | 133,27 – 389,19 | 241, 275; 242, 307 |
| A10 | Galocatequina-3-galato* | 49,88-52,33 | 1,90 – 6,70 | 242, 274 |
| A11 | Composto Desconhecido 1 (Catequina) | 53,79-55,39 | 11,11 – 41,68 | 238, 273, 350 |
| A12 | Epicatequina-3-galato* | 57,44-58,57 | 39,32 – 79,23 | 241, 277 |
| | Metilxantinas | | | |
| A3 | Teobromina | 22,43-22,74 | 2,92 – 13,19 | 241, 272 |
| A7 | Cafeína* | 38,17-38,97 | 120,83 – 186,39 | 240, 272 |

*compostos identificados por comparação com os padrões correspondentes

O pico A1, com um tempo de retenção (tR) entre os 16,21 e os 16,53 minutos e uma absorção máxima a um comprimento de onda de 271 nm ($\lambda_{\text{máx}}$), foi identificado como sendo o ácido gálico uma vez que apresentou as mesmas características (tR e $\lambda_{\text{máx}}$) que o ácido gálico, padrão também injectado com as mesmas condições de eluição.

O pico A2 foi identificado como o ácido 5-galoilquinico pois, embora não tendo um padrão disponível, este foi detectado em quantidades significativas por vários autores, com a mesma ordem de eluição e tempo de retenção relativo (Kuhr & Engelhardt, 1991; Del Rio *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011), e o espectro de UV-VIS deste pico é análogo ao deste composto.

O pico A3 (tR entre 22,43 e 22,74 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 272 nm) foi identificado como uma metilxantina, a teobromina por comparação da ordem de eluição, tempo de retenção relativo e espectro de UV-VIS com dados da literatura relativos a chá verde. (Wei *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008a).

O pico A4 (tR entre 23,19 e 23,68 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 270 nm) foi identificado como galocatequina tendo como base o tempo de retenção e o perfil cromatográfico e espectral, por comparação com um padrão autêntico.

O pico A5 (tR entre 26,53 e 27,27 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 273 nm) foi identificado como sendo a epigalocatequina tendo como base o tempo de retenção, o perfil cromatográfico e a identificação das catequinas nos chás (He *et al.*, 2009; Baptista *et al.*, 1998; Kerio *et al.*, 2013).

O pico A6 (tR entre 35,85 e 36,95 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 270 nm) foi identificado como sendo um isómero da galocatequina, uma vez que este composto apresenta um espectro de UV-VIS e um $\lambda_{\text{máx}}$ semelhantes à galocatequina diferindo apenas no tempo de retenção.

O pico A7 (tR entre 38,17 e 38,97 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 272 nm) foi identificado como cafeína tendo como base o tempo de retenção e o perfil cromatográfico e espectral, por comparação com um padrão autêntico.

O pico A8 (tR entre 46,21 e 47,02 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 279 nm) foi identificado como epicatequina tendo como base o tempo de retenção e o perfil cromatográfico e espectral, por comparação com um padrão autêntico.

O pico A9 (tR entre 47,02 e 47,87 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 275 nm e de 307 nm), situa-se no tempo de retenção relativo e ordem de eluição correspondente à epigallocatequina-3-galato; a intensidade do pico e o espectro de UV-VIS em grande parte do pico cromatográfico são coerentes com esta identificação mas a avaliação do espectro de UV-VIS na zona inicial e final do pico cromatográfico mostra existir uma co-eluição de um composto com análogo ao ácido cumárico; apesar do tempo de retenção do padrão de cumárico oscilar entre 50 min e 52 min, quanto menor a sua concentração menor é o tempo de retenção e o pico que co-elui é muito menor que o pico de 10 mg/L (a mais baixa concentração de padrão); assim apesar de surgir ao tempo de retenção de 47,78 min (chá Encosta da Bruma), considerou-se ser provavelmente o ácido cumárico.

O pico A10 (tR entre 46,21 e 47,02 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 279 nm) foi identificado como sendo a galocatequina-3-galato. Esta identificação foi feita tendo por comparação com um padrão autêntico no que diz respeito ao tempo de retenção e ao perfil cromatográfico e espectro de UV-VIS.

O pico A11 (tR entre 53,79 e 55,39 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 273 e 350 nm) foi identificado como sendo uma catequina tendo como base o perfil cromatográfico ($\lambda_{\text{máx}}$ a 273 nm), possivelmente co-eluindo com outro composto com estrutura flavonóide devido ao aparecimento de uma outra banda a 350 nm.

O pico A12 (tR entre 57,44 e 58,57 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 277 nm) foi identificado como sendo a epicatequina-3-galato, tempo por base a comparação do tempo de retenção, perfil cromatográfico e espectro de UV-VIS com um padrão autêntico.

As quatro catequinas mais abundantes nas amostras de chá verde analisadas foram a galocatequina a epicatequina, a epigallocatequina-3-galato e a epicatequina-3-galato que são também referidas na literatura como as mais abundantes no chá verde (Goto *et al.*, 1996; Dalluge *et al.*, 1998; Zuo *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008a). Estas catequinas são fortemente antioxidantes e apresentam actividade biológica relevante e benéfica para a saúde. Um estudo constatou (Kao *et al.*, 2000) que quando se reduziu significativamente a ingestão (50% a 60%) de epigallocatequina-3-galato (EGCG) na alimentação de uma população de ratinhos (machos e fêmeas), se observaram alterações na função do hipotálamo, redução do nível de seis esteróides, peso corporal, dos níveis sanguíneos de testosterona, estradiol, leptina, insulina, factor de crescimento semelhante à insulina I, LH (Luteinizing Hormone), glucose, colesterol e triglicéridos, assim como o crescimento da próstata, útero e ovários. Alguns dados de outro estudo sugerem que a administração de chá ou de EGCG a ratinhos podem proteger as proteínas de danos oxidativos (Frei & Higdon, 2003).

O pico A6 é uma catequina que foi identificada como um isómero da galocatequina e apresenta concentrações da mesma ordem que as catequinas maioritárias pelo que deverá também dar um contributo importante para a actividade antioxidante dos chás analisados.

Além das catequinas, a cafeína, a teofilina e a teobromina foram as principais metilxantinas detectadas nos chás verdes sendo a cafeína largamente maioritária, o que está de acordo com observações de outros autores (Komes *et al.*, 2010). As metilxantinas são os componentes alcalóides de chá e a sua presença é determinante na definição das propriedades organolépticas e funcionais quer dos chás verdes, quer dos chás pretos (Sharma *et al.*, 2005).

A ordem de eluição das principais catequinas em colunas C18 utilizando misturas de água e acetonitrilo acidificados é a seguinte: galocatequina, epigallocatequina, catequina, epicatequina,

epigallocatequina-3-galato (EGCG), galocatequina-3-galato, epicatequina-3-galato e catequina-3-galato (Goto *et al.*, 1996; Batista *et al.*, 1998; He *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2005; Serpen *et al.*, 2012; Fraser *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2012; El-Shahawi *et al.*, 2012).

A separação cromatográfica das catequinas em colunas C18 é significativamente influenciada pela temperatura da coluna podendo traduzir-se em co-eluições de alguns componentes (Goto *et al.*, 1996); estes autores verificaram que ocorria a co-eluição da cafeína e da catequina a temperaturas de coluna de 30°C enquanto a 50°C se verificou a co-eluição de epicatequina e epigallocatequina-3-galato. No presente trabalho a separação cromatográfica foi efectuada num sistema cromatográfico sem forno de coluna mas num laboratório com temperatura controlada; ainda assim as variações dia-noite e variações ao longo dos meses traduziram-se em flutuações da temperatura entre 20°C e 25°C. Nestas condições não foi possível detectar a catequina pelo que presumimos a sua co-eluição com a cafeína. Apesar da muito maior concentração da cafeína relativamente à concentração expectável para a catequina foi possível detectar algumas interferências no espectro de UV-VIS da cafeína nos vários tempos de retenção do pico cromatográfico que podem corroborar esta hipótese mas não foi possível obter um espectro deste possível interferente com qualidade suficiente para formular uma hipótese sobre a sua identidade.

A distribuição destes compostos nos vários chás analisados está representada na figura 3.19.

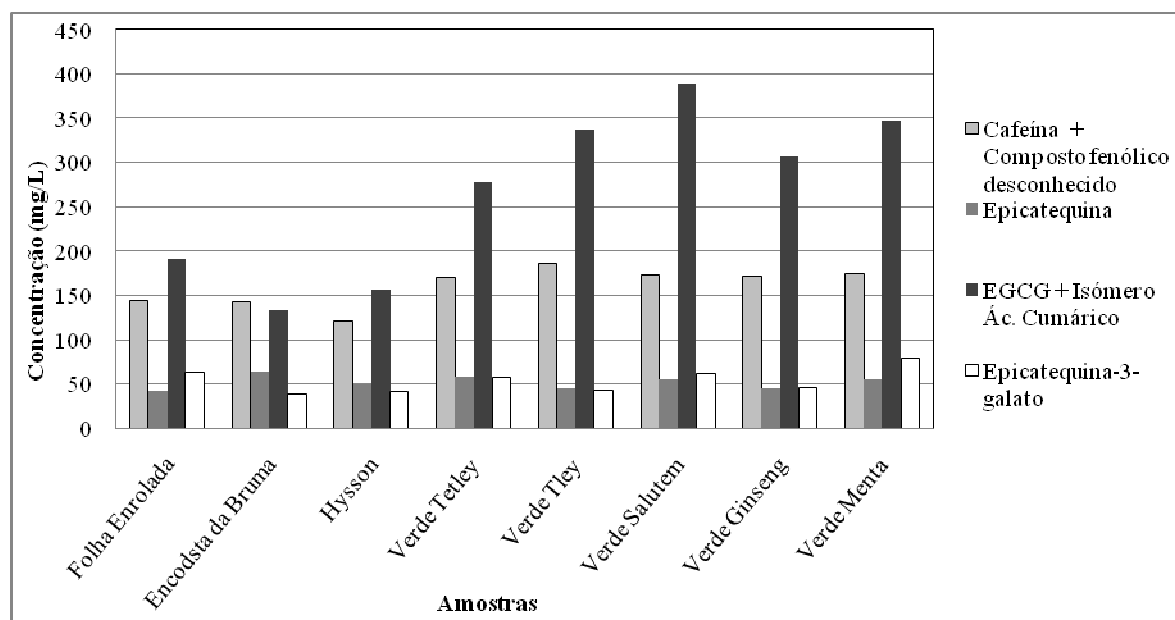


Figura 3. 19 Concentrações individuais (mg/L) dos componentes identificados a 280 nm que em alguma das infusões apresentam valores superiores a 50 mg/L.

Os resultados obtidos confirmam o teor de compostos fenólicos totais mais elevado do chá Gorreana Folha Enrolada relativamente aos restantes chás dos Açores e mostram também uma elevada concentração de alguns fenólicos em chás comerciais como o Verde Saltem ou o Verde Menta.

As concentrações dos componentes individuais do chá apresentadas acima estão coerentes com as determinadas por outro estudo (Komes *et al.*, 2010) cujos valores foram de 94,54 mg/L a 357,07 mg/L para a epigallocatequina-3-galato, de 32,58 mg/L a 178,11 mg/L para a epicatequina-3-galato, de 48,80 mg/L a 141,94 mg/L para a epicatequina e de 99,21 mg/L a 300,00 mg/L para a cafeína. Outro estudo (Reto *et al.*, 2007) apresenta para estes mesmos compostos, variações de 117 mg/L a 442 mg/L para EGCG, de 203 mg/L a 471 mg/L para a epicatequina-3-galato, de 25 mg/L a 81 mg/L para a epicatequina e de 141 mg/L a 338 mg/L para a cafeína.

Além destes compostos, foram identificados nos chás verdes mais quatro catequinas, uma metilxantina, dois ácidos hidroxibenzóicos e um composto desconhecido, os quais apresentaram concentrações na gama de 1 mg/L a 50 mg/L nos chás analisados neste trabalho (figura 3.20).

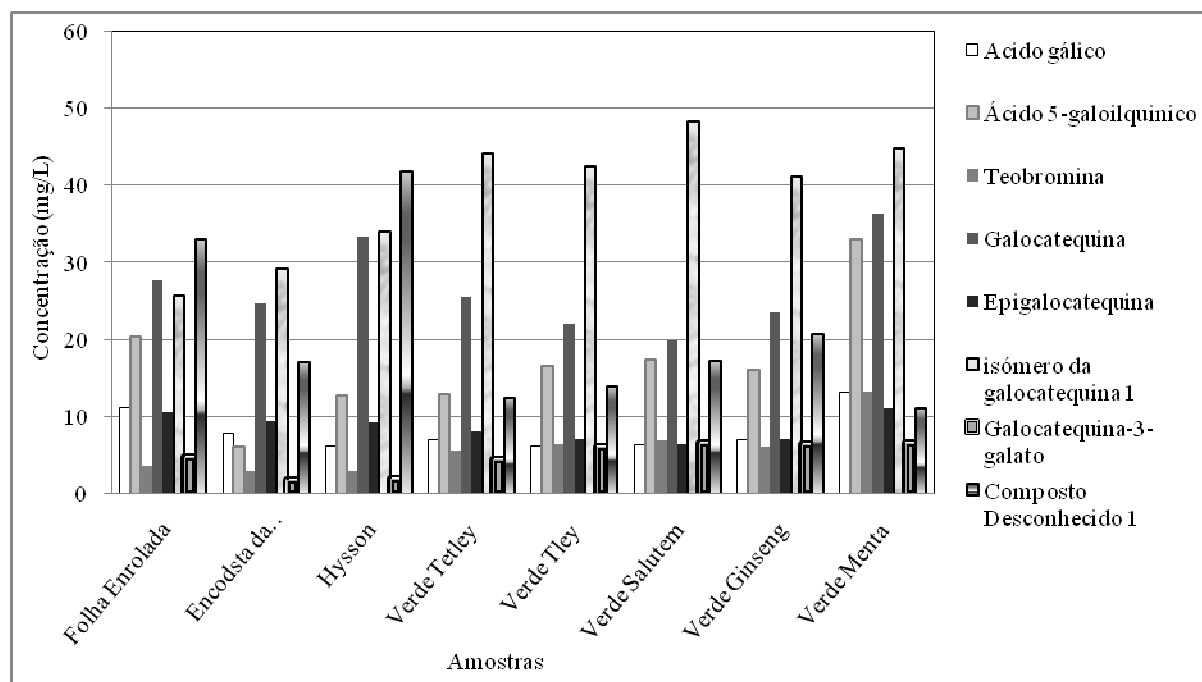


Figura 3. 20 - Concentrações individuais (mg/L) dos componentes identificados a 280 nm que em nenhuma das infusões apresentam valores superiores a 50 mg/L

Nesta série de resultados destaca-se a galocatequina e um composto fenólico desconhecido que apresentam nos chás dos Açores concentrações superiores às dos chás comerciais pelo que poderão ser considerados atributos distintivos deste tipo de chás. Em contrapartida, um composto identificado como isómero da galocatequina apresenta concentrações importantes em todos os chás analisados em particular nos chás comerciais.

Os teores apresentados acima estão coerentes com aqueles que foram determinados por outro estudo (Komes *et al.*, 2010) cujos valores foram para a galocatequina (31,39 – 192,12 mg/L), a galocatequina-3-galato (não detectável a 9,31 mg/L), a teobromina (7,55 – 66,91 mg/L) e o ácido gálico (0,73 – 14,70 mg/L).

Nos chás verdes, em média, a catequina mais abundante é a EGCG, seguida, por ordem decrescente, por ECG, EC, isómero galocatequina, galocatequina-3-galato, galocatequina e epigalocatequina. A catequina não foi detetada ou por apresentar uma concentração demasiado baixa ou por co-eluir com outro componente do chá, como já se verificou noutros estudos (Khokhar *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000).

O ácido gálico foi identificado nos vários chás verdes com teores que variaram entre 6,10 mg/L e 13,12 mg/L. O ácido gálico é um composto usado como conservante de alimentos em indústrias e como padrão de referência para a avaliação das propriedades antioxidantes de compostos puros ou de extractos vegetais de diferentes naturezas (Mishra *et al.*, 2012).

Os somatórios das áreas cromatográficas absolutas a 280 nm foram calculados considerando-se estes valores proporcionais ao somatório das concentrações dos compostos que absorvem especificamente a este comprimento de onda, ou seja, as catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos. Este cálculo permite avaliar o contributo de compostos presentes em concentrações demasiado baixas para serem avaliados individualmente uma vez que a qualidade dos respectivos espectros é muito afectada pelo ruído de fundo da coluna. Comparando as médias destas áreas cromatográficas a 280 nm para as diferentes amostras de chá através de uma análise de variância (ANOVA), e aplicando o teste de Tukey para definir grupos de médias sem diferenças significativas conclui-se que os chás verdes dos Açores apresentam teores de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos, significativamente inferiores a todos os chás verdes comerciais.

Aplicando o mesmo tratamento estatístico às concentrações dos compostos fenólicos individuais verifica-se que existem diferenças significativas entre amostras para todos os componentes do chá identificados ($p < 0,05$), com excepção da galocatequina-3-galato, o que pode significar que é um componente cuja concentração é idêntica em todas as amostras ou sendo a sua concentração é muito baixa (1,90 – 6,70 mg/L), poderá tratar-se de uma catequina extraída residualmente por limitações difusionais e a sua concentração nas infusões não é proporcional à concentração nas folhas.

Os componentes cujas concentrações individuais apresentam maior número de diferenças significativas entre amostras individuais ou grupos de amostras podem considerar-se os componentes que mais diferenciam os chás e que portanto podem ser seleccionados como parâmetros de controlo de qualidade e marcadores de origem. Esta análise foi efetuada comparando as médias das concentrações individuais através dos testes ANOVA e Teste de Tukey avaliando assim diferenças significativas e grupos homogêneos. Os compostos que originaram um maior número de grupos homogêneos no Teste de Tukey foram portanto considerados os mais diferenciadores deste conjunto de amostras.

Os compostos fenólicos que mais diferenciam os chás incluídos neste estudo são o ácido 5-galoilquínico, a epigalocatequina e o composto desconhecido, apesar das suas percentagens médias nas várias infusões serem baixas e muito baixas (5,10%, 0,17% e 1,19%, respectivamente). No entanto, estes apresentam valores significativamente diferentes para quase todos os chás verdes. O ácido 5-galoilquínico é significativamente maior no chá Verde Menta seguido do Chá Encosta da Bruma e significativamente mais baixo para o chá Folha Enrolada seguido pelo Hysson e verde Tetley. A epigalocatequina é significativamente superior para os chás verde Menta e os chás verdes dos Açores analisados. O composto desconhecido é significativamente superior nos chás dos Açores Hysson e Encosta da Bruma.

O ácido gálico, a cafeína e epigalocatequina-3-galato (EGCG) são também compostos relativamente diferenciadores. O teor de ácido gálico é significativamente mais alto no chá verde menta e mais baixo nos chás verde Hysson, Tley e Saltem. Enquanto, a cafeína e a EGCG apresentam teores significativamente mais baixos nos chás dos Açores. Os teores significativamente mais altos destes compostos foram verificados no chá verde verde Tley e Saltem, respectivamente.

Para os outros compostos analisados a diferenciação entre os chás é menor, no entanto, alguns deles podem ser diferenciadores dos chás dos Açores uma vez que a teobromina é significativamente inferior nos chás Folha Enrolada e Hysson enquanto o isómero da galocatequina é significativamente inferior nos chás dos Açores.

Apesar de algumas destas diferenças significativas poderem estar associadas às diferenças de granulometria entre chás dos Açores e chás comerciais as diferenças entre os tipos específicos de chás

(factores ambientais, fisiológicos e de produção) podem estar na origem das diferenças observadas entre chás com a mesma origem como são exemplo as diferenças observadas entre o chá verde Gorreana – Folha Enrolada e os restantes chás dos Açores bem como as diferenças entre o chá verde Saludem e os restantes chás comerciais.

Os teores de ácido-5-galoilquinico e teobromina apresentam teores significativamente mais elevados nos chás verdes comerciais aditivados em relação aos chás verdes dos Açores, o que poderá ser devido possivelmente, aos aditivos utilizados nos chás. No entanto, os chás dos Açores apresentam teores significativamente superiores de epigallocatequina em relação aos chás comerciais simples. O mesmo não se verifica em relação aos chás verde menta e verde ginseng possivelmente devido aos aditivos. Em relação aos outros compostos identificados, os chás verdes dos Açores, em relação aos verdes comerciais simples e adicionados, apresentam teores significativamente superiores de um composto desconhecido e significativamente inferior de isómero de catequina, cafeína, epigallocatequina-3-galato e galocatequina-3-galato.

Correlacionando estes compostos identificados a este comprimento de onda (280 nm) com as propriedades antioxidantes anteriormente determinadas verifica-se que as concentrações de teobromina, do isómero de galocatequina e do composto desconhecido estão fortemente correlacionadas ($0,6 < |r| < 0,9$) com o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e com a capacidade antioxidante (DPPH^{*}). O poder redutor férrico (FRAP) está fortemente relacionado com o ácido-5-galoilquinico, a teobromina, o isómero de galocatequina e a epigallocatequina-3-galato (Tabela 3.19).

Tabela 3. 19 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 280 nm nos chás verdes.

| Pico | Composto | Folin | DPPH | FRAP |
|------|---|----------|----------|---------|
| A1 | Acido gálico | -0,181 | -0,089 | 0,111 |
| A2 | Ácido 5-galoilquinico | 0,211 | 0,273 | 0,677** |
| A3 | Teobromina | 0,644** | 0,679** | 0,694** |
| A4 | Galocatequina | -0,042 | 0,037 | 0,203 |
| A5 | Epigallocatequina | -0,362 | -0,253 | -0,116 |
| A6 | Isómero da galocatequina 1 | 0,838** | 0,832** | 0,721** |
| A7 | Cafeína | 0,583* | 0,628** | 0,441 |
| A8 | Epicatequina | 0,469 | 0,475 | -0,127 |
| A9 | Epigallocatequina-3-galato + Ácido Cumárico | 0,646** | 0,636** | 0,739** |
| A10 | Galocatequina-3-galato | 0,325 | 0,332 | 0,508* |
| A11 | Composto Desconhecido 1 (Catequina) | -0,686** | -0,742** | -0,196 |
| A12 | Epicatequina-3-galato | 0,130 | 0,241 | 0,556* |

** Correlação com uma significância ao nível de 0,01; * Correlação com uma significância ao nível de 0,05

Ao contrário do que se poderia esperar e do que é vulgarmente encontrado na literatura (Zhang *et al.*, 2013), não se registaram correlações fortes ou muito fortes com as principais catequinas presentes nas amostras de chá verde e em particular com a maioritária, a epigallocatequina-3-galato (EGCG). Esta observação ser uma consequência das catequinas maioritárias se encontrarem em concentrações comparáveis nos diferentes chás e contribuírem de forma equivalente para as suas propriedades; assim poderão ser os componentes minoritários que mais variam de chá para chá e que apesar de individualmente apresentarem concentrações baixas no seu conjunto contribuem de forma significativa

para a actividade antioxidante do chá e portanto a sua concentração apresenta uma correlacção mais forte com esta propriedade.

A concentração de cafeína está fortemente correlacionada com a actividade antiradicalar o que é compreensível atendendo à estrutura deste composto. A presença no anel de um átomo de azoto com um par de electrões não ligantes associado à presença de ligações duplas adjacentes são condições ideais para permitir a reacção com radicais livres e estabilizar os compostos resultantes por ressonância e rearranjos.

Considerando a média dos grupos de compostos identificados, a 280 nm, em todos os chás verdes analisados verifica-se que a composição média dos chás verdes nas infusões de 15 minutos tem como maior percentagem catequinas e as metilxantinas, no entanto, a distribuição destes grupos de compostos não é igual para todos os chás analisados (Figura 3.21).

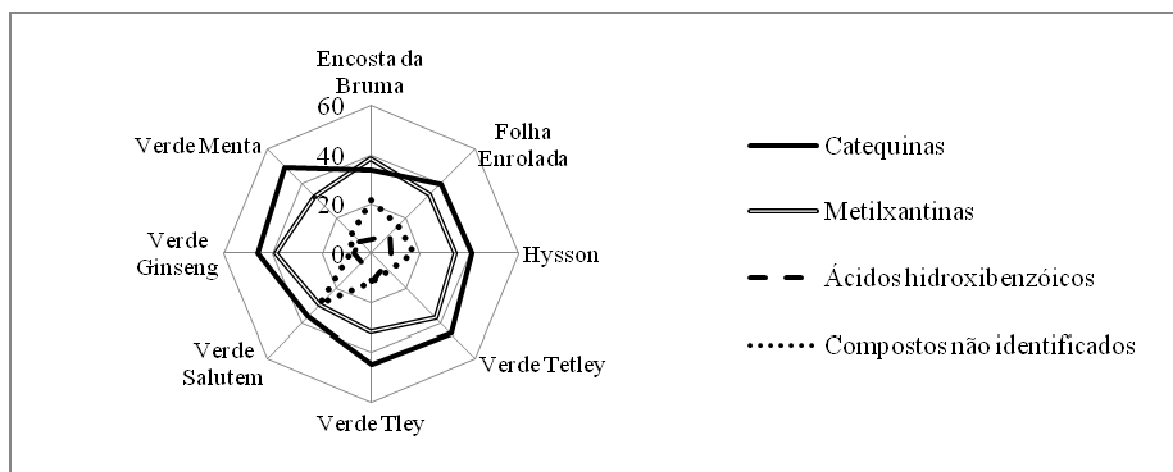


Figura 3. 21 – Teores médios de catequinas, metilxantinas, ácidos benzoicos, compostos não identificados presentes em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos.

As folhas de menta são ricas em polifenóis, tocoferóis e têm uma elevada actividade de pró-vitamina A (Fialová *et al.*, 2008; Muradian *et al.*, 2000; Tahira *et al.*, 2011). Assim, o maior efeito antioxidante da infusão de chá verde enriquecido com menta, pode ser atribuído ao enriquecimento de flavonóides a partir das folhas de menta (Padmini *et al.*, 2008).

- Análise a 320 nm

A Figura 3.22 ilustra os perfis cromatográficos de dois chás verdes, nomeadamente, o chá Encosta da Bruma (Gorreana) e o chá verde comercial, o chá Saludem, analisados por HPLC com aquisição ao comprimento de onda de 320 nm.

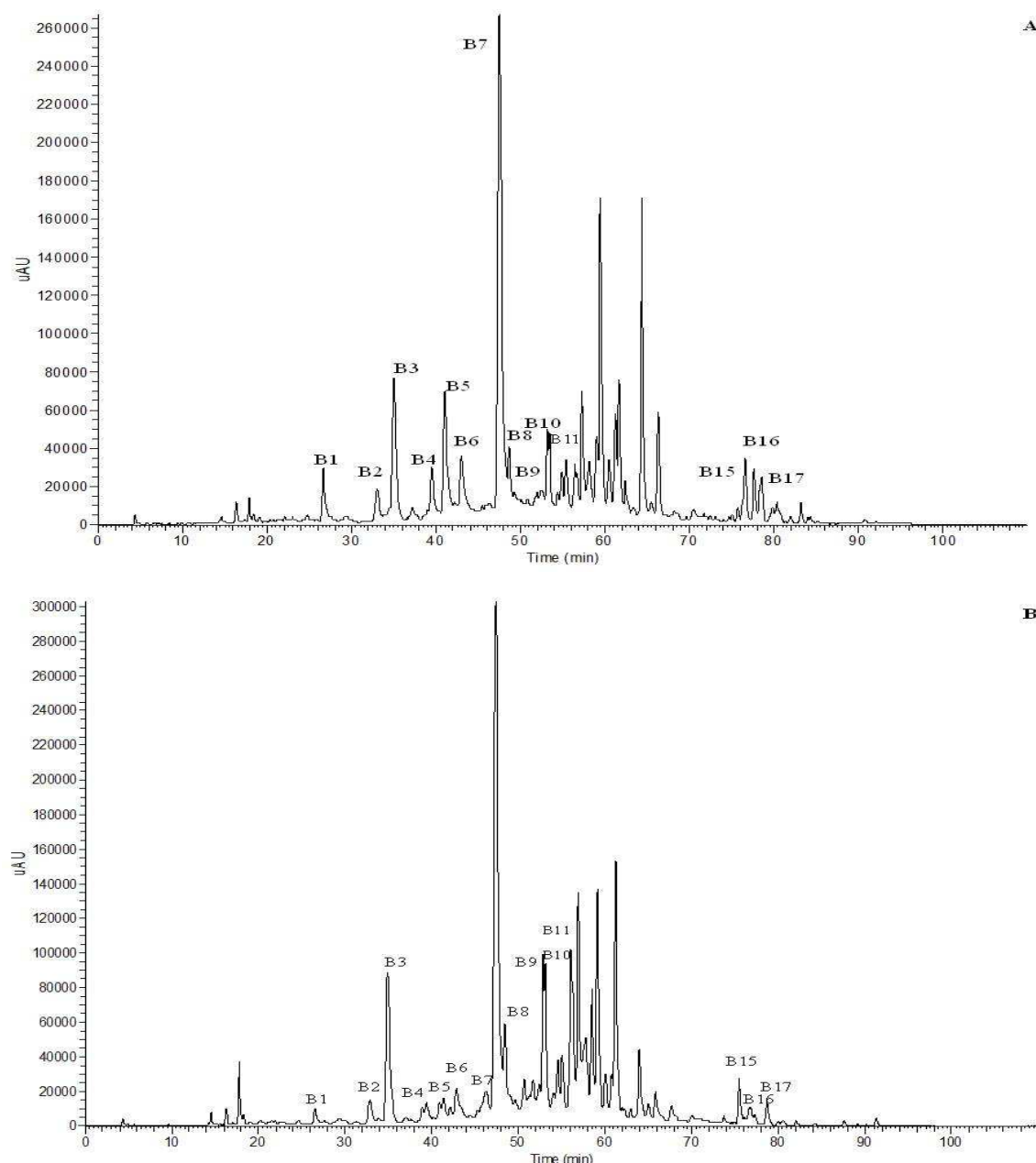


Figura 3. 22 – Cromatogramas de HPLC do chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) (A) e do chá comercial Verde Saludem (B) a 320 nm. Picos são: B1 - ácido hidroxicinâmico; B2 - ácido hidroxicinâmico - isómero ác cumárico; B3 - ácido hidroxicinâmico - isómero ác cumárico; B4 - ác hidroxicinâmico - isómero clorogénico + cafeína; B5 - Ácido Clorogénico; B6 - ácido hidroxicinâmico - derivado ác. cumárico; B7 - ác hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico; B8 - flavona glicosilada (vitexina-2"-O-ramnosídeo); B9 - flavona glicosilada; B10 - flavona glicosilada; B11 - flavonol glicosilado - derivado do Campferol; B15 - flavonol glicosilado acilado - derivado do campferol; B16 - flavonol glicosilado acilado - derivado do campferol; B17 - flavonol glicosilado acilado - derivado do campferol.

A identificação dos compostos detectados a 320 nm foi feita essencialmente por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV-VIS dos respectivos picos cromatográficos com os resultados da análise de padrões correspondentes e com resultados análogos encontrados na literatura (Tabela 3.20).

Tabela 3. 20 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 320 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|------|---|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Ácidos hidroxicinâmicos | | | |
| B1 | Ácido Hidroxicinâmico | 26,25 – 26,79 | 0,34 – 2,27 | 247, 308, 326 |
| B2 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | 32,33 – 32,99 | 0,15 – 0,82 | 242, 300 - 315 |
| B3 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | 34,42 – 35,08 | 0,30 – 2,20 | 241, 314 |
| B4 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Clorogénico + Cafeína | 39,05 – 39,58 | 2,57 – 7,31 | 238, 274, 327 |
| B5 | Ácido Clorogénico* | 40,53 – 41,16 | 2,56 – 15,78 | 242, 327 |
| B6 | Ácido Hidroxicinâmico - Derivado Ác. Cumárico | 42,46 – 42,98 | 0,31 - 1,30 | 241, 294, 308 |
| B7 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | 46,01 – 47,30 | 0,25 – 1,98 | 242, 281, 309 |
| B13 | Ácido Hidroxicinâmico - Derivado Ác. Clorogénico | 68,78 – 69,10 | 1,77 - 18,98 | 227, 246, 330 |
| B14 | Ácido Hidroxicinâmico | 72,28 – 72,57 | 0.0 – 1,06 | 221, 248, 322 |
| | Flavonas | | | |
| B8 | Flavona Glicosilada (Vitexina-2"-O-Ramnosídeo) | 48,23 – 48,63 | 3,18 – 6,02 | 237, 270, 329-345 |
| B9 | Flavona Glicosilada | 52,64 – 53,08 | 3,13 – 6,23 | 240, 272, 327-340 |
| B10 | Flavona Glicosilada | 52,91 – 53,35 | 3,22 – 7,18 | 242, 272, 329-340 |
| | Flavonóis | | | |
| B11 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 55,98 – 56,59 | 2,24 – 9,87 | 269, 340 |
| B12 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 66,47 – 66,66 | 1,88 – 5,54 | 236, 266, 340 |
| B15 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | 75,43 – 76,19 | 2,66 – 4,91 | 267, 314 |
| B16 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | 76,55 – 77,32 | 2,52 – 4,20 | 268, 314 |
| B17 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | 77,14 – 78,07 | 2,18 – 4,59 | 266, 314 |

*compostos identificados por comparação com padrões

Os três grupos de compostos fenólicos identificados tentativamente e quantificados a este comprimento de onda foram ácidos hidroxicinâmicos, flavonas e flavonóis.

Os picos B1 e B14 foram identificados como sendo ácidos hidroxicinâmicos. Estes compostos apresentam um perfil cromatográfico semelhante aos ácidos hidroxicinâmicos diferindo nos tempos de retenção e no $\lambda_{\text{máx}}$ dos padrões autênticos disponíveis.

Os picos B2, B3, B6 e B7 apresentam um espectro UV-VIS com bandas de absorção muito semelhantes às do ácido cumárico, mas surgem no cromatograma a tempos de retenção diferentes entre si e diferentes do tempo de retenção do ácido cumárico. Assim, dada a semelhança espectral identificaram-se estes compostos como isómeros do ácido cumárico.

O pico B5 (tR entre 39,05 e 39,58 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 242 e 327 nm) foi identificado como ácido clorogénico, por apresentar uma boa correspondência do tempo de retenção, ordem de eluição e espectro de UV-VIS com o padrão correspondente.

Os picos B4 e B13 foram identificados como isómeros do ácido clorogénico, uma vez que apresentaram um espectro de UV-VIS e um $\lambda_{\text{máx}}$ semelhantes ao ácido clorogénico diferindo apenas nos tempos de retenção.

Os picos B8, B9 e B10 foram identificados como sendo flavonas glicosiladas por comparação com a literatura. Estes compostos apresentaram um espectro dev UV-VIS característico das flavonas glicosiladas com $\lambda_{\text{máx}}$ de 237, 270 e 340 nm (Lin *et al.*, 2008).

Por comparação com a literatura (Lin *et al.*, 2008; Sakakibara *et al.*, 2003), os picos B11 e B12 foram identificados como sendo flavonóis glicosilados, pois apresentaram $\lambda_{\text{máx}}$ 269 e 340 nm e os picos B15, B16 e B17 identificados como sendo flavonóis glicosilados acilados. Estes compostos apresentaram $\lambda_{\text{máx}}$ de 267 e 314 nm.

Calcularam-se os somatórios das áreas cromatográficas absolutas a 320 nm, como foi referido atrás para tentar contabilizar o contributo de compostos fenólicos que absorvem especificamente a este comprimento de onda (ácidos hidroxicinâmicos, flavonas e flavonóis) mas que pela sua baixa concentração não tinham uma definição do espectro de UV-VIS suficiente para se poder fazer uma sugestão sobre a sua identidade. As médias dos somatórios das áreas absolutas a 320 nm foram comparadas utilizando uma análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey de forma a encontrar diferenças significativas e a definir grupos homogéneos. Verificou-se que as médias dos somatórios das áreas a 320 nm não apresentam diferenças significativas, embora, quando analisados individualmente, essas diferenças existam. A presença de teores de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas e flavonóis, compostos com actividade biológica específica bastante elevada, pode contribuir de forma significativa para a actividade antioxidante e outras propriedades biológicas dos chás dos Açores apesar da concentração destes componentes ser bastante inferior à das catequinas.

Em particular, o chá Gorreana – Encosta da Bruma apresenta valores do somatório das áreas a 320 nm superior aos todos os outros chás, à excepção do chá verde adicionado com menta.

Como foi referido, as concentrações (mg/L) destes compostos são menores das dos compostos identificados a 280 nm, conforme figuras abaixo (Figuras 3.23 e 3.24), atingindo-se um valor de concentração máxima de quase 19 mg/L.

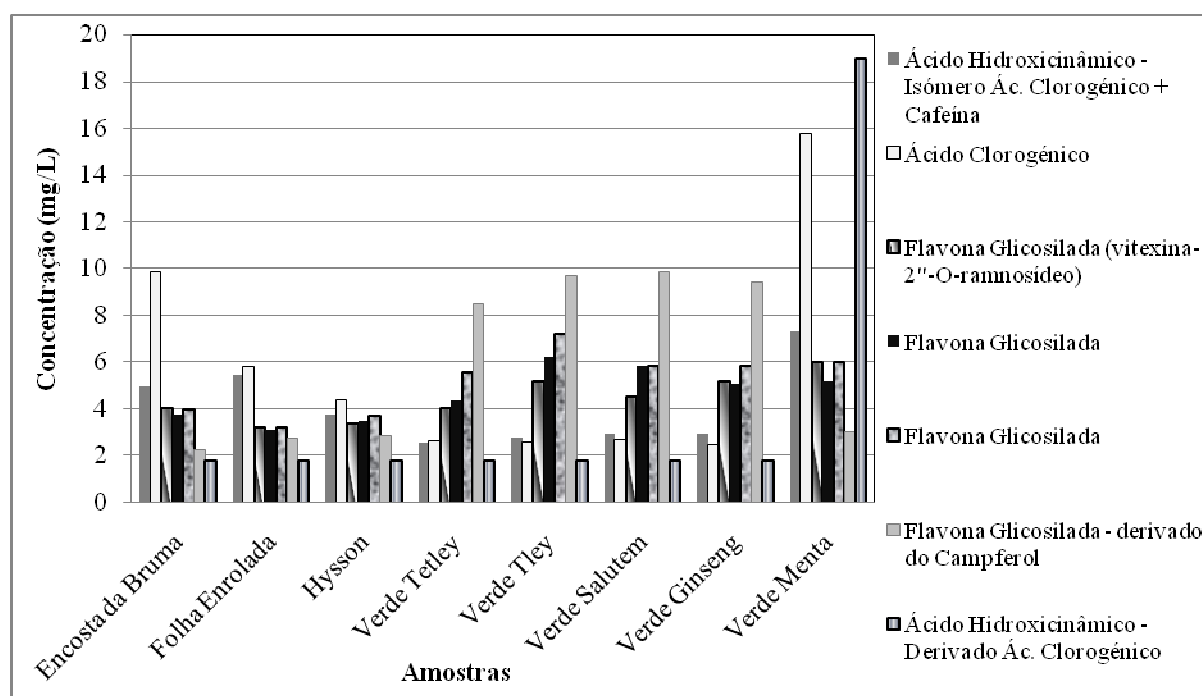


Figura 3. 23 - Concentrações individuais (mg/L) dos compostos identificados a 320 nm que em alguma das infusões apresentam valores superiores ou iguais a 6 mg/L.

Os teores de ácido clorogénico apresentados acima, são da mesma ordem de grandeza dos que foram determinados por outro estudo (Komes *et al.*, 2010) cujos valores variaram entre o não detectável e os 4,23 mg/L.

Estudos mostraram que 33% do ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico) ingerido é absorvido no intestino. Assim, cerca de dois terços deste atinge o cólon, onde pode ser metabolizado pela microflora do cólon. No cólon, o ácido clorogénico é provavelmente hidrolisado em ácido cafeico e ácido quínico e estes metabolitos podem ser absorvidos pois são detectados posteriormente na urina (Higdon & Frei, 2007). Estes processos metabólicos permitem que os compostos fenólicos exerçam a sua actividade antioxidante em todo o organismo começando pelo sistema digestivo mas estendendo a sua acção a outros sistemas e aos seus componentes celulares, através da absorção intestinal e da mobilização no plasma.

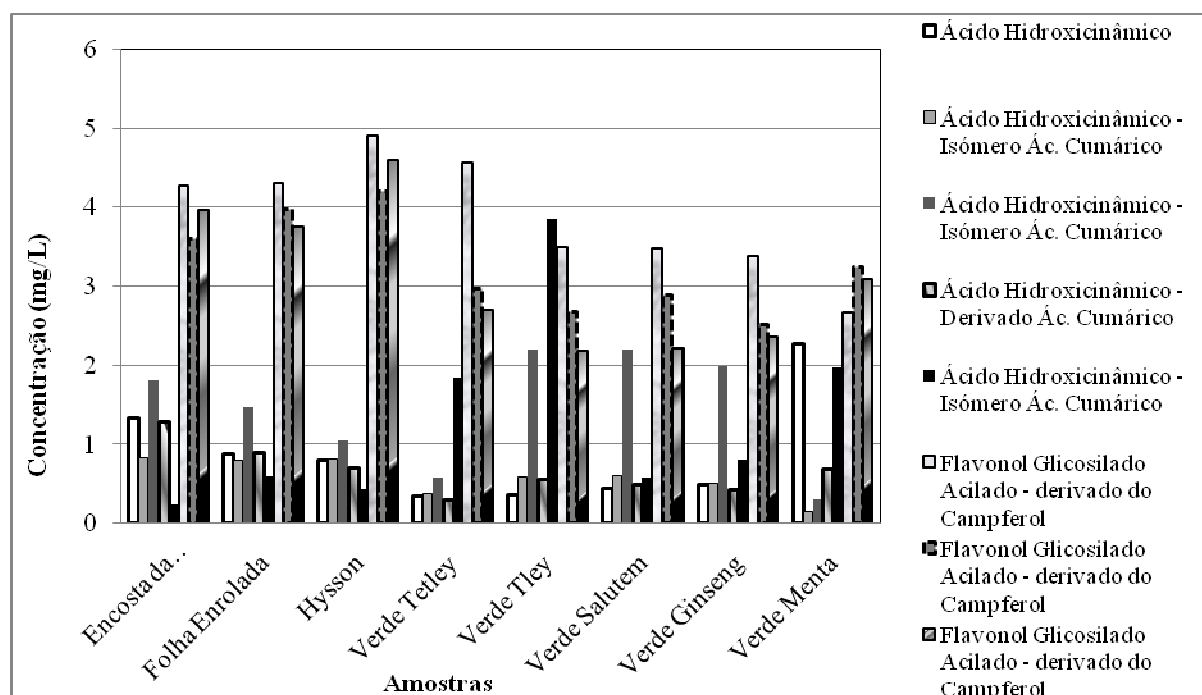


Figura 3. 24 - Concentrações individuais (mg/L) dos compostos identificados a 320 nm que em alguma das infusões apresentam valores inferiores ou iguais a 6 mg/L.

Atendendo ao perfil de concentrações apresentado na Figura 3.24 podemos observar que os chás verdes do Açores apresentam concentrações particularmente elevadas de três flavonóis glicosilados acilados que não surgem em concentrações tão elevadas nos chás comerciais.

Do grupo de compostos identificados a este comprimento de onda verifica-se que o composto que mais diferencia os vários chás verdes analisados é um ácido hidroxicinâmico, isómero do ácido cumárico (B3). Este composto faz a diferenciação de quase todos os chás individualmente, excepto os chás Tley e Salutem.

Outros compostos nomeadamente, ácido hidroxicinâmico (B1), ácido clorogénico (B5), flavona glicosilada (B9), e os flavonóis glicosilados acilados, ambos derivados do campferol, (B15 e B17) são relativamente diferenciadores. Os teores médios destes compostos nos chás analisados foram de 1,22%, 2,65%, 2,60%, 1,95% e 1,18%, respectivamente. sendo os teores dos ácidos hidroxicinâmicos significativamente superiores nos chás dos Açores e no chá Verde Menta e os teores de flavonóis significativamente superiores nos chás dos Açores (B15 e B17) e no chá Verde Tley (B15). Contrariamente, os chás dos Açores apresentam teores significativamente inferiores da flavona glicosilada (B9).

Para os outros compostos analisados a diferenciação entre os chás é menor, no entanto, alguns deles podem ser diferenciadores dos chás dos Açores. Assim, o teor de ácido hidroxicinâmico, isómero do ácido cumárico (B2) é significativamente superior nos chás dos Açores, o teor de flavonol glicosilado acilado, derivado do Campferol (B16) é significativamente superior nos chás Encosta da Bruma e Hysson e os teores dos ácidos hidroxicinâmicos, isómero ácido clorogénico (B4) e isómero ácido cumárico (B6) são significativamente superiores nos chás Encosta da Bruma e Folha Enrolada.

Calculando a concentração global destes grupos de compostos nos chás analisados a partir das concentrações dos seus componentes individuais obteve-se a seguinte distribuição apresentada na figura 3.25.

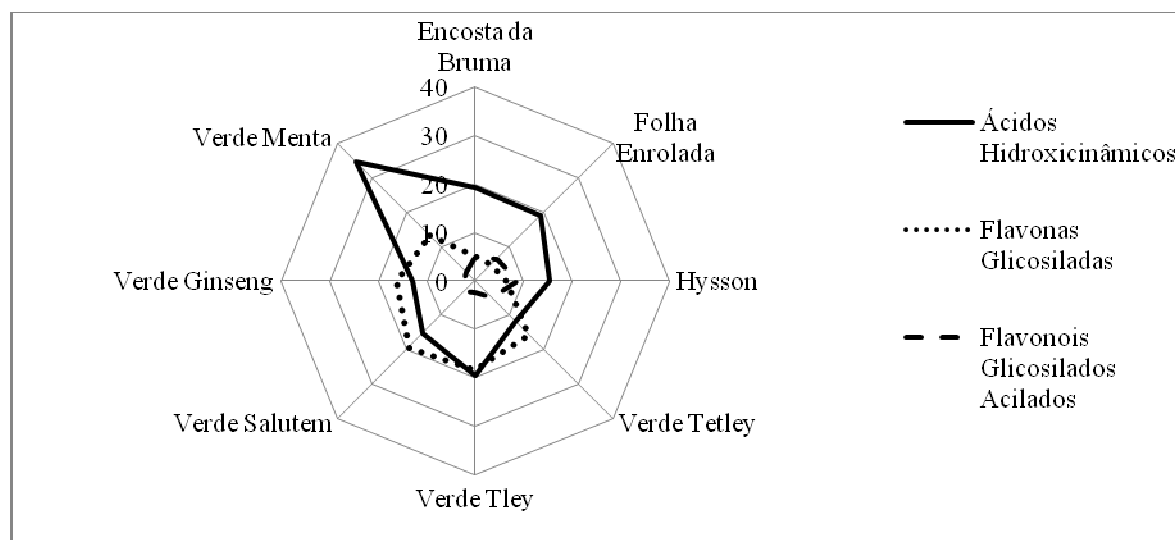


Figura 3. 25 – Teores médios de ácidos hidroxicinâmicos, as flavonas glicosiladas e os flavonóis glicosilados acilados presentes em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos.

A nível dos teores médios dos grupos de chás, considerando a origem, os compostos identificados a 320 nm não apresentam diferenças significativas, embora, quando analisados individualmente, essas diferenças existam.

Quanto aos vários compostos analisados verifica-se que as flavonas glicosiladas (B8 e B11) são compostos diferenciadores dos três grupos de chás, apresentando os chás dos Açores teores significativamente mais baixo.

Verifica-se ainda que os chás verdes dos Açores, quando comparados com os chás verdes comerciais simples e adicionados, apresentam teores significativamente superiores dos ácidos hidroxicinâmicos, derivados do ácido cumárico (B2 e B6) e dos flavonóis glicosilados acilados, derivados do Campferol (B16 e B17), e, teores significativamente inferiores de flavonas glicosiladas (B9 e B10). O ácido hidroxicinâmico, derivado do ácido cumárico, B7 nos chás verdes dos Açores apresenta teores significativamente inferiores em relação aos chás comerciais simples. Em relação aos outros compostos identificados não existem diferenças significativas para com os chás comerciais.

Os ácidos hidroxicinâmicos demonstraram ter efeitos benéficos em várias doenças, especialmente na aterosclerose e cancro. Estudos mostraram que os ácidos hidroxicinâmicos exercem uma acção protectora contra o cancro do colon por controlo do ciclo celular e da supressão da apoptose desregulada. No chá estes efeitos foram atribuídos aos ácidos cumárico e clorogénico (El-Seedi *et al.*, 2012).

Correlacionando estes compostos identificados a este comprimento de onda (320 nm) com as propriedades antioxidantes anteriormente determinadas verifica-se que o ácido hidroxicinâmico B2 e as flavonas glicosiladas B8, B9 e B10 estão fortemente relacionados ($0,6 < |r| < 0,9$) com o teor de

fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e com a capacidade antioxidante (DPPH^{*}). O flavonol glicosilado acilado B16 está fortemente relacionada com a capacidade antioxidante (DPPH^{*}) e a flavona glicosilada B9 está fortemente relacionada com o poder redutor férrico (FRAP) (Tabela 3.21).

Tabela 3. 21 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 320 nm nos chás verdes.

| Pico | Composto | Folin | DPPH | FRAP |
|------|---|----------|----------|---------|
| B1 | Ácido Hidroxicinâmico | 0,168 | 0,172 | 0,103 |
| B2 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | -0,648** | -0,739** | -0,556* |
| B3 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | -0,071 | -0,254 | -0,223 |
| B4 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Clorogénico + Cafeína | -0,123 | -0,088 | 0,038 |
| B5 | Ácido Clorogénico | 0,183 | 0,206 | 0,071 |
| B6 | Ácido Hidroxicinâmico - Derivado Ác. Cumárico | -0,374 | -0,420 | -0,560* |
| B7 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | 0,400 | 0,589* | 0,472 |
| B8 | Flavona Glicosilada (Vitexina-2"-O-Ramnosídeo) | 0,762** | 0,718** | 0,479 |
| B9 | Flavona Glicosilada | 0,762** | 0,718** | 0,615* |
| B10 | Flavona Glicosilada | 0,766** | 0,787** | 0,566* |
| B11 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 0,432 | 0,398 | 0,308 |
| B12 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 0,438 | 0,487 | 0,499* |
| B13 | Ácido Hidroxicinâmico - Derivado Ác. Clorogénico | 0,438 | 0,487 | 0,499* |
| B14 | Ácido Hidroxicinâmico | 0,436 | 0,486 | 0,498* |
| B15 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | -0,583* | -0,503* | -0,497* |
| B16 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | -0,612* | -0,561* | -0,240 |
| B17 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | -0,521* | -0,510* | -0,392 |

** Correlação com uma significância ao nível de 0,01; * Correlação com uma significância ao nível de 0,05

Embora os glicosídeos sejam normalmente mais fracos que os antioxidantes agliconas (Burda *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002), a biodisponibilidade é, por vezes reforçada por haver uma ligação a glucose (Heim *et al.*, 2002).

No entanto se considerarmos os somatórios das áreas cromatográficas a 320 nm verificamos que se incluem neste somatório muitos compostos que não foram identificados pelas razões já anteriormente apresentadas mas que correspondem a mais de 50% da área cromatográfica total (Figura 3.26).

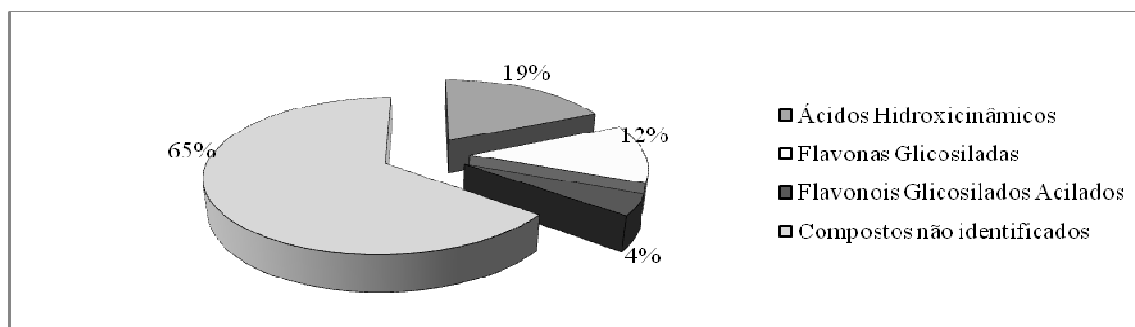


Figura 3. 26 – Percentagem relativa dos diferentes grupos de compostos analisados a 320 nm em infusões de 15 minutos de chás verdes.

- Análise a 360 nm

A Figura 3.27 ilustra os perfis cromatográficos de dois dos chás verdes analisados, nomeadamente, o chá Encosta da Bruma (Gorreana) e o chá verde comercial, o chá Saludem. determinados por HPLC ao comprimento de onda de 360 nm. Neste comprimento de onda foram seleccionados e quantificados um conjunto de sete flavonóis glicosilados.

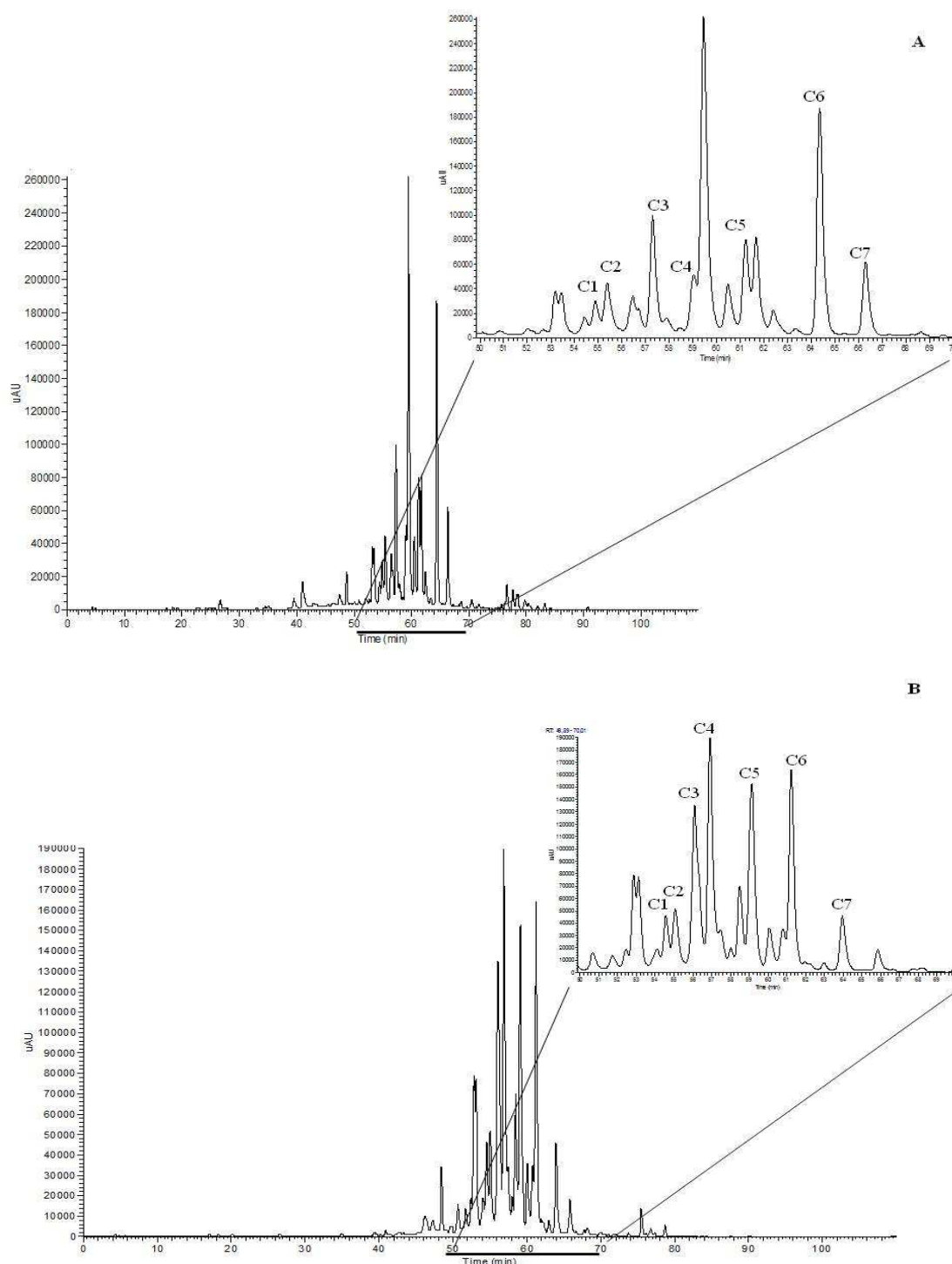


Figura 3. 27 – Cromatogramas de HPLC do chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) (A) e do chá comercial Verde Saludem (B) a 360 nm. Picos são: C1 - Flavonol Glicosilado + catequina; C2 - Flavonol Glicosilado; C3 - Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina; C4 - Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina; C5 - Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol; C6 - Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol; C7 - Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol.

A identificação dos compostos detectados (Tabela 3.22) foi feita essencialmente por comparação da ordem de eluição e dos espectros de UV-VIS dos picos cromatográficos com resultados análogos encontrados na literatura (Lin *et al.*, 2008; Sakakibara *et al.*, 2003). Apesar de todos os picos serem identificados como flavonóis glicosilados, os picos C3 e C4 foram definidos como sendo derivados da quercetina por apresentarem λ máx a 237, 256 e 354 nm, enquanto os picos C5, C6 e C7 foram definidos como sendo derivados do campferol por estes compostos apresentarem λ máx a 238, 265 e 346 a 356 nm.

Tabela 3. 22 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 360 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | λ máx. (nm) |
|------|---|---------------------------|----------------------|---------------------|
| | Flavonóis | | | |
| C1 | Flavonol Glicosilado + Catequina | 54,36 – 54,92 | 3,13 - 4,41 | 239, 272, 358 |
| C2 | Flavonol Glicosilado | 54,85 – 55,39 | 4,67 – 7,73 | 238, 254, 358 |
| C3 | Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina | 56,03 – 57,12 | 3,02 – 12,26 | 237, 256, 358 |
| C4 | Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina | 56,82 – 59,24 | 13,15 – 21,61 | 237, 256, 354 |
| C5 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 59,26 – 61,61 | 3,86 – 12,14 | 238, 265, 346 |
| C6 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 61,14 – 64,17 | 8,07 – 12,39 | 238, 265, 349 |
| C7 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 63,88 – 66,11 | 3,54 – 5,63 | 237, 265, 346-354 |

Foram calculados os somatórios das áreas cromatográficas a 360 nm e este valor foi considerado representativo da concentração global de flavonóis glicosilados. O tratamento estatístico das médias dos somatórios das áreas absolutas a 360 nm (análise de variância e teste de Tukey) permitiu agrupar estas médias em grupos homogêneos verificando-se que os chás Verde Menta apresentam teores significativamente superiores deste grupo de compostos enquanto o chá verde dos Açores Hysson e Verde Saludem apresentam os teores significativamente mais baixos de flavonóis glicosilados (Tabela 3.23).

Tabela 3. 23 – Média, desvios-padrão e coeficientes das áreas cromatográficas determinadas a 360 nm para os diferentes chás analisados

| Amostras de Chá | Média | Desvio Padrão | Coef Variância (%) |
|-----------------------------------|------------------------|---------------|--------------------|
| Gorreana, Folha Enrolada, Verde | 22492293 ^b | 149689 | 0,67 |
| Gorreana, Encosta da Bruma, Verde | 24846510 ^{bc} | 66315 | 0,27 |
| Gorreana, Hysson, Verde | 16467555 ^a | 479506 | 2,91 |
| Tetley, Verde | 26204923 ^c | 8473 | 0,03 |
| Tley, Verde | 25059838 ^{bc} | 388253 | 1,55 |
| Saludem, Verde | 17131509 ^a | 1991937 | 11,63 |
| Saludem, Verde, Ginseng | 23383748 ^{bc} | 1165146 | 4,98 |
| Lipton, Verde, Menta | 30563553 ^d | 15424 | 0,05 |
| Total | 23268741 | 4545140 | 19,53 |

Nos chás verdes analisados neste trabalho os flavonóis glicosilados mais abundantes foram um derivado da quercetina (C4) com uma gama de concentração entre 13,15 e 21,61 mg/L e um derivado do campferol (C6) com uma gama de concentração entre 8,07 e 12,39 mg/L, correspondendo a uma percentagem média presente nos chás de 19,07 % e 11,71%, respectivamente. As concentrações individuais dos compostos identificados a 360 nm foram calculadas a partir de uma recta de calibração construída com padrões de quercetina e estão representadas na figura 3.28.

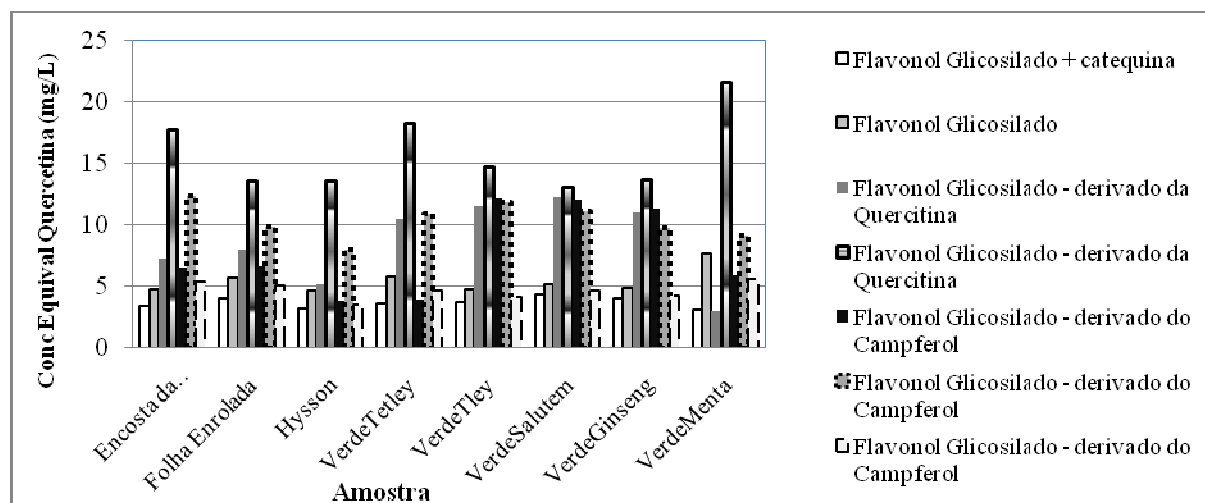


Figura 3. 28 - Compostos identificados e quantificados a 360 nm nos chás verdes.

Tem sido demonstrado que a quercetina exerce efeitos metabólicos positivos na regulação de processos celulares em patologias como o cancro da mama e o cancro do ovário (Rice-Evans *et al.*, 1996).

O campferol tem mostrado actividade antiproliferativa e induz a apoptose de diversos tipos de células tumorais (Issa *et al.*, 2013).

Do grupo de compostos identificados a este comprimento de onda verifica-se que o flavonol glicosilado (C3) diferencia individualmente todos os chás analisados. O chá verde Menta é o chá que apresenta teores de flavonóis glicosilados significativamente inferiores aos outros chás, seguindo-se os chás dos Açores, Hysson, Folha Enrolada e Encosta da Bruma.

O outro composto que também diferencia os chás analisados é o flavonol glicosilado (C7). Aqui o chá Gorreana Hysson apresenta um teor deste flavonol significativamente mais baixo que os restantes enquanto os chás Encosta da Bruma, Folha Enrolada e Verde Menta apresentam os teores significativamente mais altos.

Considerando todos compostos identificados em todos os chás verdes analisados a 360 nm, verifica-se que tal como no caso da detecção a 320 nm, existem uma série de compostos que não foram identificados por estarem em concentrações muito pequenas ou por se encontrarem identificados noutros comprimentos de onda. A composição média das infusões de 15 minutos preparados a partir de chás verdes, expressa em percentagem da área cromatográfica total, vem expressa na Figura 3.29.

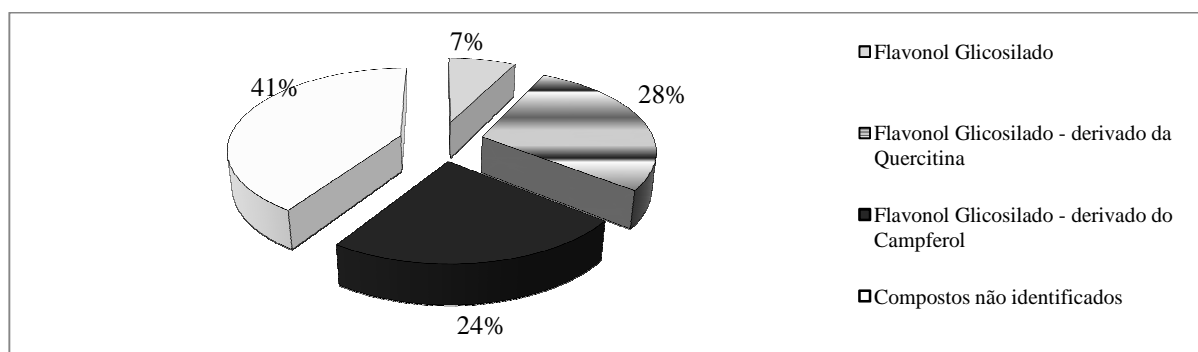


Figura 3. 29 – Percentagem relativa dos diferentes grupos de compostos detectados a 360 nm em infusões de 15 min de chás verdes.

Os chás verdes comerciais apresentaram os teores mais elevados de flavonóis glicosilados identificados a 360 nm, o pode ser causado pela adição dos suplementos do chá verde uma vez que não se encontraram diferenças significativas entre os chás verdes dos Açores e os comerciais simples. Quando analisados individualmente o flavonol glicosilado (C3) apresenta teores significativamente superiores nos chás verdes comerciais simples em relação aos outros grupos de chás (chás dos Açores e chás comerciais aditivados).

Apesar do campferol apresentar elevados níveis de actividade antioxidante específica (Brighente *et al.*, 2007), os compostos derivados glicosilados não apresentam tais níveis de actividade. Estudos mostraram que o grau de glicosilação afecta significativamente as propriedades antioxidantes dos compostos. Por exemplo, as agliconas de quercetina e miricetina revelaram-se mais activas do que correspondentes glicosídeos (Hopia & Heinonen, 1999; Kahkonen *et al.*, 1999).

Avaliaram-se as correlações entre os compostos quantificados a 360 nm e as propriedades antioxidantes anteriormente avaliadas (Tabela 3.24).

Tabela 3. 24 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 360 nm nos chás verdes.

| Pico | Composto | Folin | DPPH | FRAP |
|------|---|--------|--------|--------|
| C1 | Flavonol Glicosilado + Catequina | -0,221 | -0,313 | -0,034 |
| C2 | Flavonol Glicosilado | 0,239 | 0,367 | 0,461 |
| C3 | Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina | 0,056 | 0,015 | -0,053 |
| C4 | Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina | 0,442 | 0,578* | 0,101 |
| C5 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 0,277 | 0,116 | 0,194 |
| C6 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 0,174 | 0,195 | -0,311 |
| C7 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 0,008 | 0,055 | -0,137 |

** Correlação com uma significância ao nível de 0,01; * Correlação com uma significância ao nível de 0,05

Verifica-se que a correlação dos flavonoides glicosilados com as propriedades antioxidantes é apenas moderadamente forte, o que não é de estranhar tendo em conta as concentrações baixas que estes compostos apresentaram nos chás analisados. Em particular, observaram-se correlações moderadamente fortes entre os flavonóis glicosilados (C4) e o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), entre os flavonóis glicosilados (C1, C2 e C4) e a actividade antiradicalar e entre os flavonóis glicosilados (C2 e C6) e o poder redutor férrico (FRAP).

Quando se analisa o conjunto dos compostos identificados nas infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás verdes verifica-se que os teores dos grupos considerados são diferentes consoante as origens consideradas (figura 3.30).

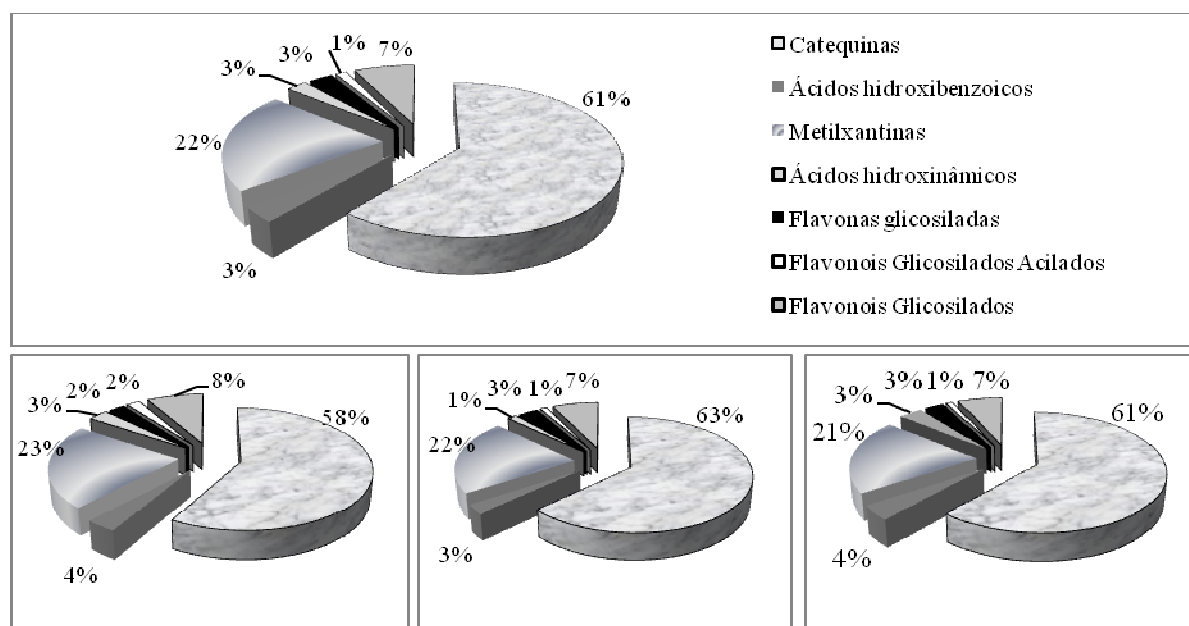


Figura 3. 30 - Concentração média (%) dos compostos identificados nas infusões de 15 min preparadas a partir de chás verdes (em cima: chás analisados; em baixo da esquerda para a direita: Açores; comerciais; e comerciais adicionados).

Verifica-se que os chás verdes dos Açores são aqueles que apresentam uma menor percentagem de catequinas (58%) o que pode conferir a estes chás um sabor mais agradável, uma vez que as catequinas são compostos solúveis em água que contribuem para a amargura e adstringência do chá verde (Balentine *et al.*, 1997; Reto *et al.*, 2007).

Verifica-se ainda que os chás verdes dos Açores são aqueles que apresentam uma maior percentagem de metilxantinas, que na sua maioria é a cafeína. Nos humanos a cafeína estimula o coração, o sistema nervoso central e o sistema respiratório. É também diurética e tem o efeito de retardar a fadiga (Rahim *et al.*, 2014).

As catequinas, por terem diferentes estruturas, têm diferentes propriedades levando a diferentes benefícios para a saúde. Torna-se por isso importante saber a concentração de cada uma delas nas infusões. Um estudo verificou que a actividade antioxidante no chá verde é mais elevada quando nos chás existe um maior conteúdo de epigallocatequina-3-galato e de epigallocatequina (Toschi *et al.*, 2000).

Da comparação dos chás verdes verifica-se ainda que, os chás verdes dos Açores e os chás comerciais aditivados, apresentam, maior percentagem de ácidos hidroxinâmicos, os quais têm mostrado diversos efeitos biológicos positivos entre os quais a capacidade de inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade *in vitro* (LDL) (Kahkonen *et al.*, 1999).

3.3.3.1.2 - Chás Pretos

Os chás pretos dos Açores e os adquiridos no comércio local e provenientes de outros países foram analisados por HPLC, em condições idênticas às utilizadas para os chás verdes. Tal como estes foram injectados em natureza pois a matriz chá não tem interferentes analíticos em quantidades significativas e contém os analitos em estudo em concentrações compatíveis com a sensibilidade da técnica.

- Análise a 280 nm

A Figura 3.31 ilustra os perfis cromatográficos em HPLC de dois chás pretos, nomeadamente, o chá Broken Leaf (Gorreana) e o chá preto comercial, o chá English Breakfast com aquisição selectiva ao comprimento de onda de 280 nm.

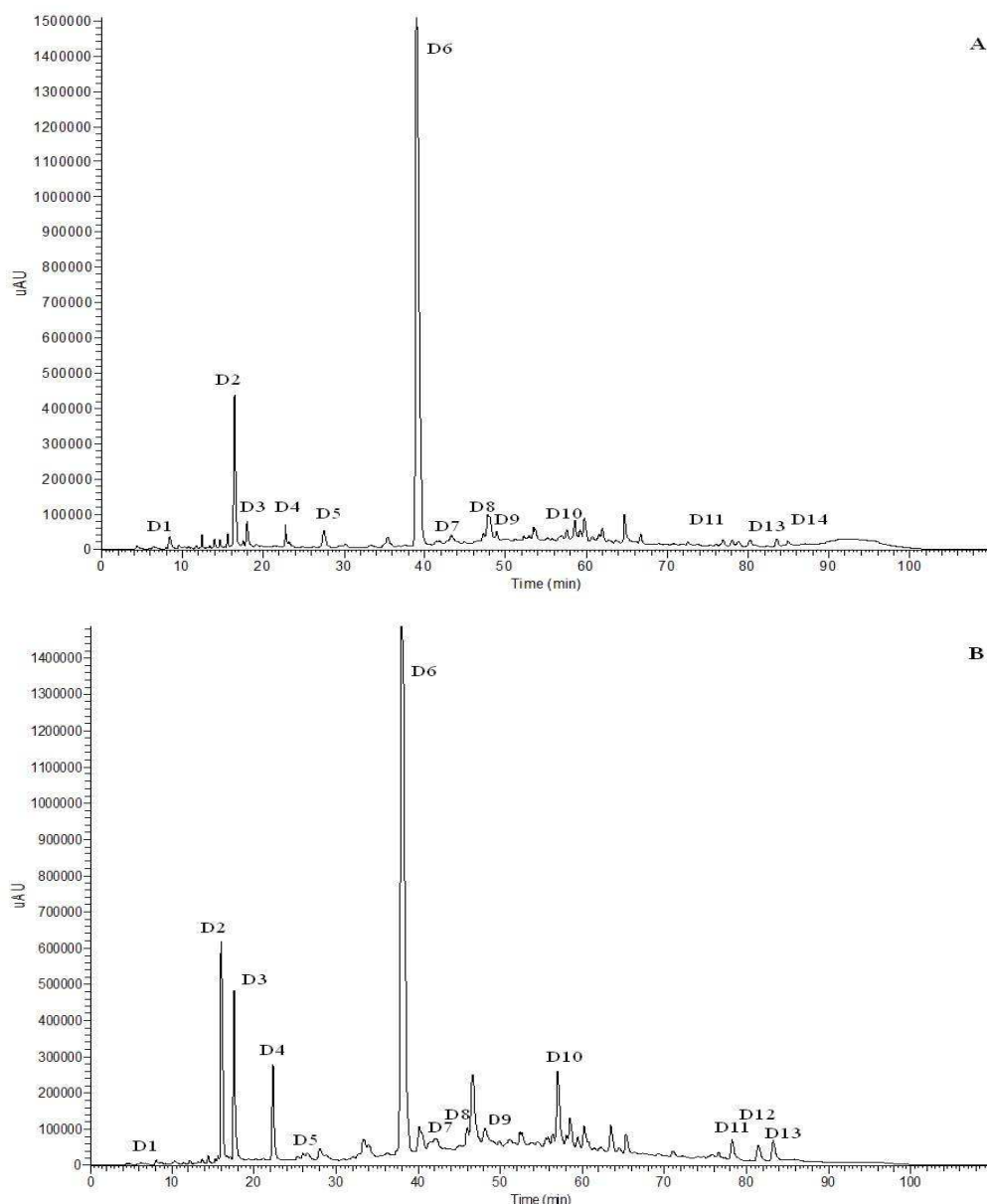


Figura 3. 31 – Cromatogramas de HPLC do chá preto Broken Leaf (Gorreana) (A) e do chá comercial preto English Breakfast (B) a 280 nm. Picos são: D1 – Ácido hidroxibenzoico; D2 - Acido gálico; D3 - Ácido 5-galoilquinico; D4 - Teobromina; D5 – Teofilina; D6 – Cafeína; D7 - Composto fenólico desconhecido; D8 - Epicatequina; D9 - Epigallocatequina-3-galato; D10 - Epicatequina-3-galato; D11 - Teoflavina-3-galato; D13 - Teoflavina-3'-galato; D14 - Teoflavina-3,3'-digalato

O perfil de HPLC dos chás pretos distingue-se de uma forma geral dos perfis cromatográficos dos chás verdes por apresentar menos picos referentes a catequinas e os que tem são de área muito menor reflectindo a menor abundância destes componentes no chá preto e pelo aparecimento de compostos menos encontrados no chá verde como é o caso das teoflavinas e teorrubiginas e de alguns ácidos hidroxibenzoicos (Sang *et al.*, 2011).

Estas diferenças resultam em grande parte do processo de fermentação durante o qual as catequinas (principais fenólicos do chá verde) se envolvem em reacções de polimerização ou degradação pelo que o seu teor nas infusões decresce relativamente ao mesmo chá verde; por outro lado algumas das reacções das catequinas e outros fenólicos mais complexos resultam na libertação de ácido gálico e outros ácidos hidroxibenzoicos pelo que não é de estranhar que as concentrações destes componentes possam ser mais elevadas do que as encontradas no chá verde (Kim *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos identificados em chás pretos a 280 nm são listados na tabela 3.25, indicando simultaneamente as suas janelas de retenção e as gamas de concentração em que existem nas amostras, expressas em mg/L e calculadas a partir dos padrões correspondentes ou equivalentes; são também apresentados os comprimentos de onda aos quais cada um dos compostos identificados apresentou absorvância máxima.

Um primeiro critério de selecção para a escolha dos picos a identificar foi o de a sua área cromatográfica ser igual ou superior a 1% da área cromatográfica total; numa segunda fase do tratamento de dados eliminaram-se também os picos cromatográficos, que apesar de obedecerem ao primeiro critério não apresentavam um espectro de UV-VIS com qualidade suficiente para se distinguir do ruído da linha de base ou de espectros de compostos co-eluentes.

Tabela 3. 25 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás pretos ao comprimento de onda de 280 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Ácidos hidroxibenzoicos | | | |
| D1 | Ácido hidroxibenzoico | 7,89 – 8,46 | 0,29 – 1,89 | 234, 266 |
| D2 | Ácido gálico* | 15,79 – 16,45 | 4,24 – 32,92 | 237, 271 |
| D3 | Ácido 5-galoilquinico | 17,39-22,63 | 0,82 – 19,47 | 237, 274 |
| | Catequinas | | | |
| D7 | Composto fenólico desconhecido | 41,97 – 42,91 | 10,75 – 18,42 | 241, 295 |
| D8 | Epicatequina* | 45,71 – 47,09 | 7,79 – 30,40 | 241, 277 |
| D9 | Epigallocatequina-3-galato (EGCG) * | 47,74 – 49,02 | 0,19 – 11,19 | 242, 274 |
| D10 | Epicatequina-3-galato* | 56,57 – 58,01 | 1,62 – 28,66 | 239, 277 |
| D11 | Teoflavina-3-galato | 78,14 – 78,96 | 0,00 – 7,64 | 233, 266, 371, 450 |
| D12 | Cinamaldeído | 78,97 – 79,03 | ----- | 238, 289 |
| D13 | Teoflavina-3'-galato | 81,41 – 82,40 | 0,00 – 5,45 | 224, 270, 368, 450 |
| D14 | Teoflavina-3,3'-dialato | 83,20 – 83,87 | 0,00 – 6,99 | 236, 271, 372, 444 |
| | Metilxantinas | | | |
| D4 | Teobromina | 22,15-22,63 | 1,74 – 12,38 | 239, 274 |
| D5 | Teofilina | 26,49 – 28,15 | 0,72 – 2,99 | 237, 273 |
| D6 | Cafeína* | 37,77-38,64 | 62,16 – 182,93 | 240, 272 |

*compostos identificados por comparação com padrões

Os picos D1, D2 e D3 foram identificados como sendo ácidos hidroxibenzóicos, sendo D1 (tR entre 7,89 e 8,46 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 266 nm) um ácido não identificado. O pico D2, com um tempo de retenção (tR) entre os 15,79 e os 16,45 minutos e uma absorção máxima com um comprimento de onda de 271 nm ($\lambda_{\text{máx}}$), foi indicado como sendo o ácido gálico uma vez que apresentou as mesmas características (tR e $\lambda_{\text{máx}}$) que o ácido gálico, padrão também injectado com as mesmas condições de eluição, e do mesmo pico em chás verdes.

O pico D3 (tR entre 17,39 e 22,63 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 274 nm) foi identificado como o ácido 5-galoilquinico que, embora não tendo um padrão disponível, como já foi referido, foi detectado em quantidades significativas por vários autores nos chás pretos e o pico apresentou características idênticas de ordem de eluição e espectro de UV-VIS (Wang *et al.*, 2008a; Del Rio *et al.*, 2004; Bajorun *et al.*, 2012).

Os picos D4 (tR entre 22,15 e 22,63 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 274 nm) e D5 (tR entre 26,49 e 28,15 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 272 nm) foram, identificados como sendo a teobromina e a teofilina, respectivamente, com os mesmos critérios de semelhança cromatográfica e espectral. Estes compostos foram identificados por vários autores em chás pretos (Peng *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008).

O pico D6 (tR entre 37,77 e 38,64 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 272 nm) foi identificado como cafeína tendo como base o tempo de retenção e o perfil cromatográfico, por comparação com um padrão autêntico.

O pico D7 (tR entre 41,97 e 42,91 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 295 nm) foi identificado apenas como composto fenólico desconhecido pois apesar de ter um $\lambda_{\text{máx}}$ de 295 nm não apresentou um espectro UV-VIS análogo a alguma das famílias de compostos que absorvem nesta zona do espectro.

Os picos D8 (tR entre 45,71 e 47,09 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 277 nm), D9 (tR entre 47,74 e 49,02 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 274 nm) e D10 (tR entre 56,57 e 58,01 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 277 nm) foram identificados como epicatequina, epigallocatequina-3-galato e epicatequina-3-galato, respectivamente, tendo como base o tempo de retenção e o espectro de UV-VIS, por comparação com um padrão autêntico.

Os picos D11 (tR entre 78,14 e 78,96 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 233, 266, 371 e 450 nm), D13 (tR entre 81,41 e 82,40 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 224, 270, 368, 450 nm) e D14 (tR entre 83,20 e 83,87 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 236, 271, 372, 444 nm) foram identificados como sendo teoflavina-3-galato, teoflavina-3'-galato e teoflavina-3,3'-digalato, respectivamente, por comparação com outros autores (Sakakibara *et al.*, 2003; Erol *et al.*, 2010), tendo em consideração o espectro de UV-VIS e a ordem de eluição dos picos correspondentes.

O pico D12 (tR entre 78,97 e 79,03 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 238 e 289 nm) aparece exclusivamente no chá preto-Canela-Laranja. Este pico muito intenso apresenta um dos λ máximos de absorção entre 280 e 300 nm e poderá ser atribuído ao cinamaldeído, composto muito abundante na canela e com características cromatográficas e espectroscópicas compatíveis (Lin *et al.*, 2010). O extracto aquoso de canela apresenta elevada actividade antioxidante e constitui uma fonte natural rica em antioxidantes (Dudonné *et al.*, 2009) e tem mostrado efeitos benéficos nos diabetes, na intolerância à glucose, na actividade antimicrobiana e contra de vários tipos de cancro. A canela mostra ainda acção protectora contra a peroxidação lipídica, o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio (Jain *et al.*, 2011), pelo que a sua associação ao chá preto pode contribuir positivamente para a bioactividade das correspondentes infusões.

O composto detectado em maior concentração nos chás pretos analisados foi a cafeína, que apresentou teores na gama de 62,16 mg/L a 182,93 mg/L, o que está de acordo com dados da literatura referentes a chá preto (Yang *et al.*, 1997a; Horzic *et al.*, 2009). A disponibilidade da cafeína presente nas folhas é um factor que depende da idade da própria folha, sendo que folhas mais velhas contém menos cafeína do que as folhas mais jovens (Lin *et al.*, 2003).

Os compostos identificados com concentração superior a 20 mg/L em algum dos chás analisados são o ácido gálico (4,24 – 32,92 mg/L), a epicatequina (7,79 – 30,40 mg/L) e a epicatequina-3-galato (1,62 – 28,66 mg/L).

A distribuição destes compostos nos vários chás analisados está representada na Figura 3.32.

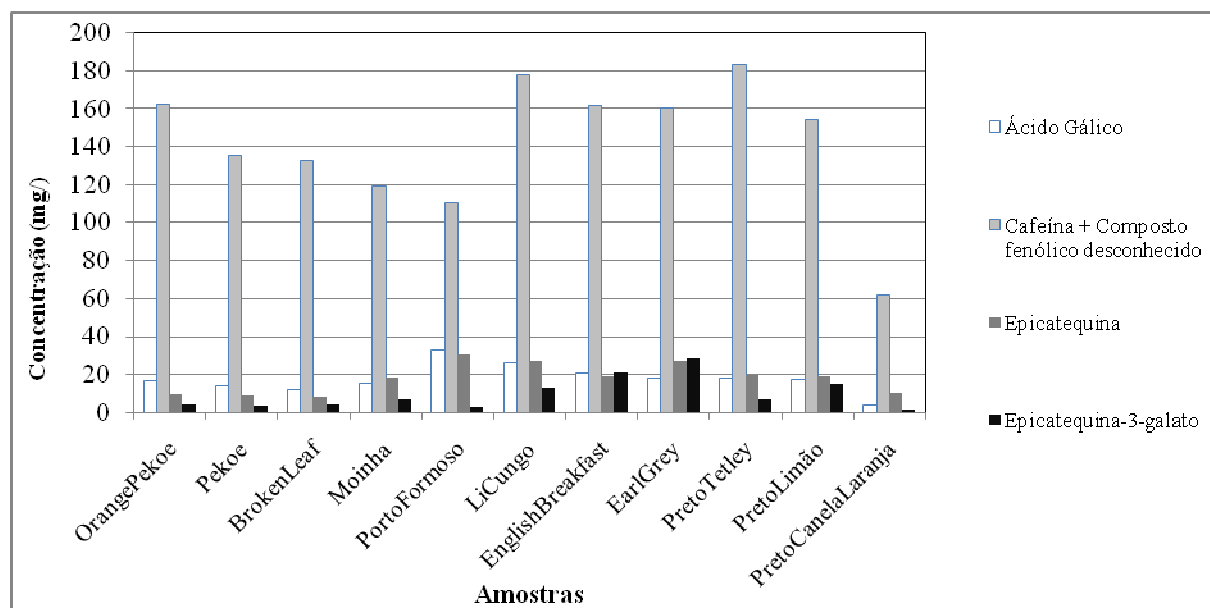


Figura 3. 32 – Gráfico com as concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em alguma das infusões apresentam valores superiores a 20 mg/L.

Como foi referido anteriormente a cafeína não apresentou um espectro puro pois efectuando a sua determinação em diferentes pontos do pico cromatográfico observaram-se distorções do espectro típico da cafeína indicando que ocorre co-eluição com outro componente do chá. No entanto é possível por esta análise perceber que a cafeína é o componente largamente maioritário pelo que é o que mais contribui para a área cromatográfica. Assim por questões de simplicidade de expressão a área deste pico cromatográfico e a respectiva concentração serão designadas neste texto como correspondendo à cafeína apesar de nas tabelas e gráficos estar sempre explicitamente indicada a presença de um composto co-eluinte. O conjunto de resultados apresentados na Figura 3.32 evidenciam uma tendência dos chás pretos dos Açores para exibirem um teor de cafeína mais baixo do que os chás pretos comerciais analisados com excepção do chá Preto-Canela-Laranja. Este último, estando no grupo dos chás pretos aditivados pode apresentar um valor tão distinto de cafeína porque parte da sua massa seca é composta pelos aditivos canela e laranja que não contribuem para o teor de cafeína.

O relativamente baixo teor de cafeína do chá preto dos Açores pode ser um factor de competitividade comercial uma vez que pode beneficiar da presença da mesma quantidade de componentes fenólicos mas apresentando menor concentração de cafeína não terá o mesmo efeito estimulante sobre o sistema nervoso central que é desaconselhado para algumas pessoas. Por exemplo o chá preto Porto Formoso dos Açores apresenta concentrações de ácido gálico e epicatequina superiores ao chá comercial Li-Cungo e no entanto contém uma quantidade substancialmente menor de cafeína.

Nos chás pretos as catequinas, tais como a epigallocatequina-3-galato, a epicatequina-3-galato e a epicatequina, são oxidadas ou condensadas durante o processo de fermentação originando moléculas mais complexas (dímeros e polímeros), tais como as teaflavinas (3-6%) e as teorrubiginas (12-18%), (Sang *et al.*, 2011; Novak *et al.*, 2010; Vermeer *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 1997a; Almajano *et al.*, 2008). Tal facto faz com que as concentrações das catequinas nos chás pretos sejam bastante inferiores

aos chás verdes como foi verificado neste trabalho e noutros realizados por outros autores (Del Rio *et al.*, 2004; Rahim *et al.*, 2014).

A par do decréscimo do conteúdo de catequinas, durante a fermentação, há um aumento da concentração do ácido gálico o que está de acordo com outros estudos (Kim *et al.*, 2011; Gramza *et al.*, 2005; Zuo *et al.*, 2002).

Além destes compostos, foram identificados nos chás pretos outros compostos presentes em concentrações inferiores a 20 mg/L, e que se encontram representados nas Figuras 3.33 e 3.34.

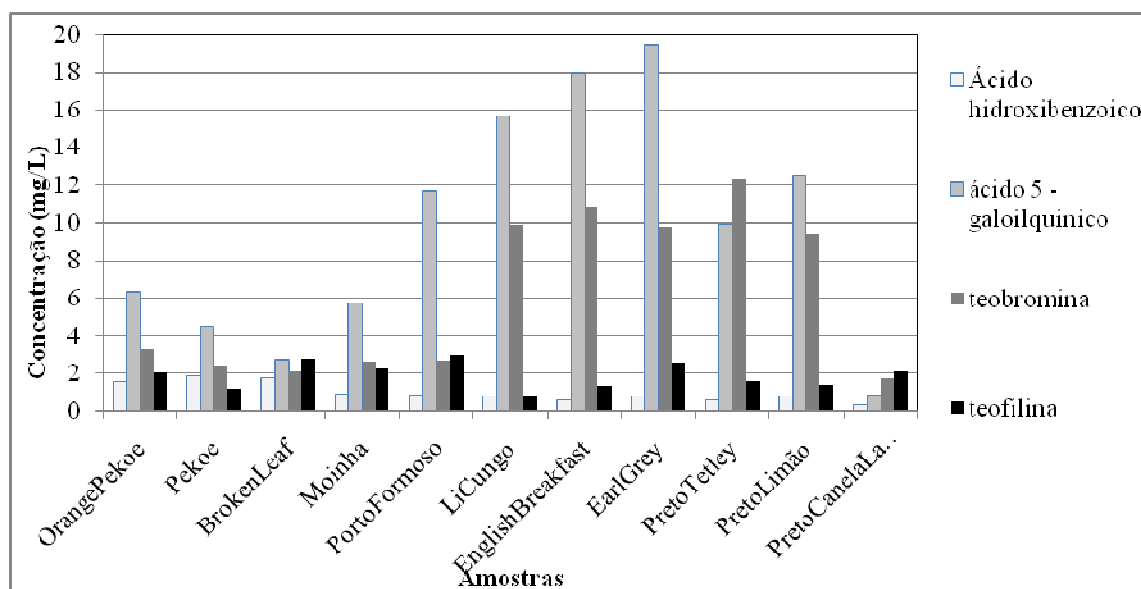


Figura 3. 33 – Concentrações individuais de ácidos hidroxibenzóicos e metilxantinas presentes em chás pretos, na gama de 0 a 20 mg/L.

De acordo com os resultados obtidos verifica-se que a soma dos teores da teobromina e teofilina nas infusões corresponde a cerca de 1/10 do teor de cafeína das mesmas infusões o que está de acordo com dados publicados em estudos anteriores (Horzic *et al.*, 2009; Friedman *et al.*, 2006).

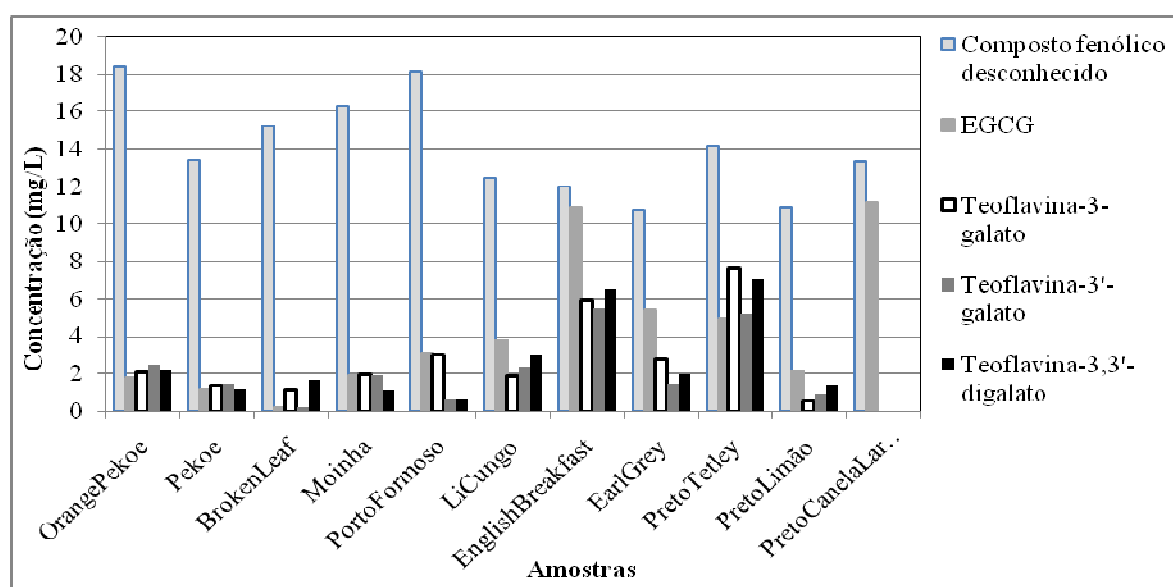


Figura 3. 34 – Concentrações individuais de catequinas e teoflavinas presentes em chás pretos na gama de 0 a 20 mg/L.

Uma característica distintiva dos chás pretos dos Açores foi a presença de um composto fenólico desconhecido em concentrações superiores às encontradas nos chás comerciais. O espectro de UV-VIS deste composto não apresenta características que permitam sugerir a que família de compostos fenólicos pertence e o seu tempo de retenção também não permitiu estabelecer analogias com nenhum padrão disponível. No entanto, dada a sua relevância nos chás pretos dos Açores, será tentada a sua identificação por LC-MS-MS como parte dos trabalhos a desenvolver na sequência desta tese.

As teoflavinas identificadas nos chás pretos são uma mistura de teoflavina-3-galato, teoflavina-3'-galato e teoflavina-3,3'-dialato, sendo estas responsáveis pela cor avermelhada e adstringência do chá preto (Yang *et al.*, 1997a; Leung *et al.*, 2001; Scharbert *et al.*, 2004; Sang *et al.*, 2011; Balentine *et al.*, 1997; Almajano *et al.*, 2008; Vermeer *et al.*, 2008). Estes componentes são ainda responsáveis por outros componentes do sabor do chá preto além da adstringência (Scharbert *et al.*, 2004; Almajano *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2011). Tem sido sugerido que as teoflavinas têm um efeito na redução do stress oxidativo agindo como um antioxidante com capacidade de eliminação dos radicais livres (Arent *et al.*, 2010).

Os somatórios das áreas cromatográficas absolutas a 280 nm foram avaliados como representativos dos teores de catequinas, metilxantinas e ácidos benzoicos totais e as médias destes valores foram comparadas através de uma análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey; os resultados obtidos indicam que os chás pretos dos Açores são os que apresentam teores mais baixos de catequinas, metilxantinas e ácidos benzoicos ($p < 0,05$).

Os componentes que são mais diferenciadores dos chás pretos são o ácido gálico (D2), a teobromina (D4), a cafeína (D6) e a teoflavina-3-galato (D11), apesar serem compostos presentes nas infusões em concentrações médias bastante distintas (8,82%, 2,11%, 48,16% e 0,77%, respectivamente).

A concentração de ácido gálico é significativamente maior no chá Porto Formoso seguido do Chá Li-Cungo e English Breakfast e significativamente mais baixa no chá preto+Canela+Laranja seguido pelos chás Broken Leaf, Moínha e Orange Pekoe. O valor baixo no chá preto + Canela + Laranja é como já foi referido natural dado que se trata de um chá com aditivos.

A concentração de teobromina é significativamente superior nos chás comerciais Tetley e English Breakfast e significativamente inferior no chá preto+Canela+Laranja seguido pelos vários chás dos Açores, apesar de haver diferenciações entre eles.

A cafeína é o composto maioritário a 280 nm nos chás pretos, sendo este bastante diferenciador, como foi referido. Os chás que apresentam teores significativamente superiores de cafeína são os chás pretos comerciais Tetley e Li-Cungo e teor significativamente inferior o chá Preto+Canela+Laranja.

Verifica-se ainda que o conteúdo de cafeína no chá dos Açores Orange Pekoe (Gorreana) é superior ao Pekoe (Gorreana), o que deverá estar relacionado com a idade das folhas uma vez que o teor de cafeína diminui do broto, para a segunda folha (Song *et al.*, 2012).

A teoflavina-3-galato (D11) apresenta teores significativamente mais elevados para os chás Tetley e English Breakfast e um teor inferior para o chá preto+Canela+Laranja.

Os compostos ácido-5-galoilquínico (D3), a epicatequina-3-galato (D10), a teoflavina-3'-galato (D13) e a teoflavina-3,3'-dialato (D14) são relativamente diferenciadores apresentando percentagens médias de 3,84%, 2,30%, 0,61% e 0,66%, respectivamente, nos chás analisados. Para todos estes compostos o chá que apresenta um teor mais baixo é o chá preto+canela+laranja. Os teores significativamente mais elevados são os dos chás Tetley e English Breakfast para as teoflavinas galato e dos chás English Breakfast e Earl Grey para a epicatequina-3-galato e para o ácido-5-galoilquínico.

Para os outros compostos analisados a diferenciação entre os chás é menor, no entanto, alguns deles podem ser diferenciadores dos chás dos Açores uma vez que o ácido hidroxibenzoico identificado como D1 tem teores significativamente superiores para os chás Orange Pekoe, Broken Leaf e Pekoe, seguido de teores superiores para os chás Moínha e Porto Formoso, todos eles com origem nos Açores. A teofilina apresenta concentrações significativamente superiores para os chás Porto Formoso, Broken Leaf e Earl Grey e a epicatequina teores significativamente superiores para o chá Porto Formoso e significativamente inferiores para os chás Broken Leaf, Pekoe e Orange Pekoe.

Os teores inferiores dos vários compostos identificados nas infusões de 15 minutos dos chás dos Açores relativamente aos chás pretos comerciais pode, tal como foi referido anteriormente para os chás verdes, ter como causa a apresentação do próprio chá uma vez que os chás pretos dos Açores se apresentam disponíveis comercialmente em folhas enquanto os chás comerciais se encontram moídos. Calculando a média dos somatórios das áreas cromatográficas a 280 nm e das concentrações de cada composto individual para cada grupo de chás pode avaliar-se se há características que os distingam em grupo de uma forma estatisticamente significativa.

A média dos somatórios das áreas cromatográficas para o conjunto dos chás dos Açores foi mais baixa que as restantes médias, mas alguns componentes individuais destacaram-se nos chás dos Açores: foi o caso do ácido hidroxibenzoico (D1) e da epicatequina-3-galato (D10).

Correlacionando os compostos identificados a este comprimento de onda (280 nm) com as propriedades antioxidantes anteriormente determinadas (Tabela 3.26) verifica-se que a teobromina está muito fortemente relacionada ($|r| > 0,9$) com o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e com a capacidade antioxidante (DPPH^{*}), enquanto o ácido benzoico (D1), o ácido-5-galoilquinico (D3), o composto fenólico desconhecido (D7) e a teoflavina-3-galato (D11) estão fortemente relacionadas ($0,6 < |r| < 0,9$) com o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e o ácido-5-galoilquinico (D3), o composto fenólico desconhecido (D7), a teoflavina-3-galato (D11) e a teoflavina-3,3'-digalato (D14) estão fortemente relacionadas com a capacidade antioxidante (DPPH^{*}). O poder redutor férrico (FRAP) está fortemente relacionado com o ácido-5-galoilquinico (D3), a teobromina (D4), o composto fenólico desconhecido (D7) e a teoflavina-3-galato (D11).

Tabela 3. 26 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 280 nm nos chás pretos.

| Picos | Compostos | Folin | DPPH | FRAP |
|-------|--------------------------------|----------|----------|----------|
| D1 | Acido Hidroxibenzoico | -0,706** | -0,520* | -0,289 |
| D2 | Acido Gálico | 0,169 | 0,276 | 0,159 |
| D3 | Acido-5-Galoilquinico | 0,705** | 0,833** | 0,626** |
| D4 | Teobromina | 0,900** | 0,922** | 0,653** |
| D5 | Teofilina | -0,435* | -0,405 | -0,314 |
| D6 | Cafeina | 0,461* | 0,594** | 0,438* |
| D7 | Composto Fenolico Desconhecido | -0,664** | -0,689** | -0,638** |
| D8 | Epicatequina | 0,543** | 0,579** | 0,353 |
| D9 | Epigallocatequina-3-galato | 0,407 | 0,324 | 0,021 |
| D10 | Epicatequina-3-galato | 0,700** | 0,843** | 0,700** |
| D11 | Derivado Teoflavina Galato 1 | 0,448* | 0,544** | -0,015 |
| D13 | Derivado Teoflavina Galato 2 | 0,471* | 0,557** | 0,066 |
| D14 | Derivado Teoflavina Galato 3 | 0,521* | 0,609** | 0,143 |

** Correlação com uma significância ao nível de 0,01; * Correlação com uma significância ao nível de 0,05

Estes resultados indicam que todos estes compostos com correlações fortes ou muito fortes com as propriedades funcionais do chá contribuem para a sua bioactividade independentemente da sua concentração nas infusões ser maioritária ou minoritária.

Considerando a média dos grupos de compostos identificados, a 280 nm, em todos os chás pretos analisados verifica-se que a composição média nas infusões de 15 minutos destes chás tem como maior percentagem as metilxantinas, no entanto, a distribuição destes grupos de compostos não é igual para todos os chás analisados (figura 3.35).

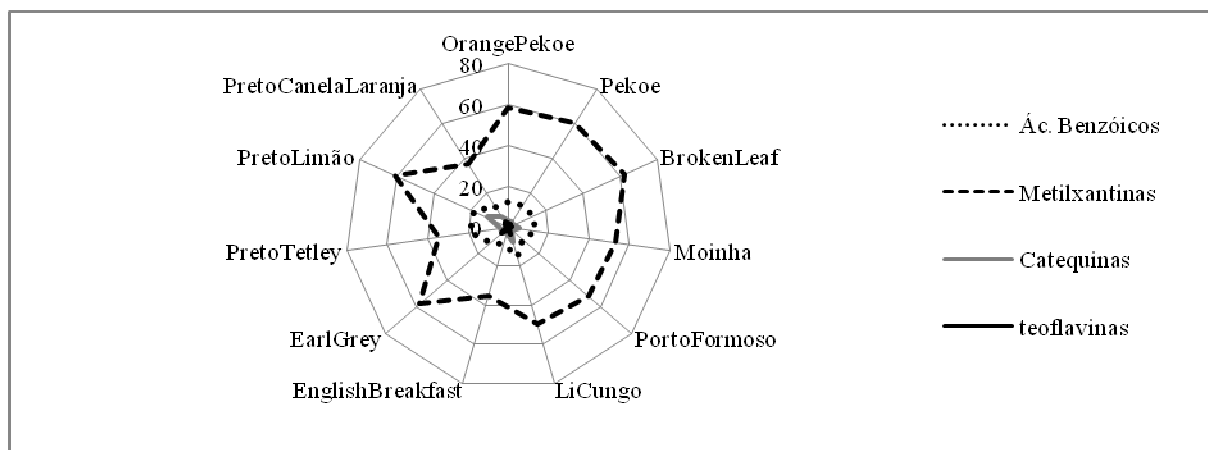


Figura 3. 35 – Teores médios (%) de catequinas, metilxantinas, ácidos benzoicos e teoflavinas identificados em cada tipo de chá preto nas respectivas infusões de 15 minutos.

- Análise a 320 nm

A Figura 3.36 ilustra os perfis cromatográficos em HPLC ao comprimento de onda de 320 nm de dois chás pretos, nomeadamente, o chá Broken Leaf (Gorreana) e o chá preto comercial, o chá English Breakfast.

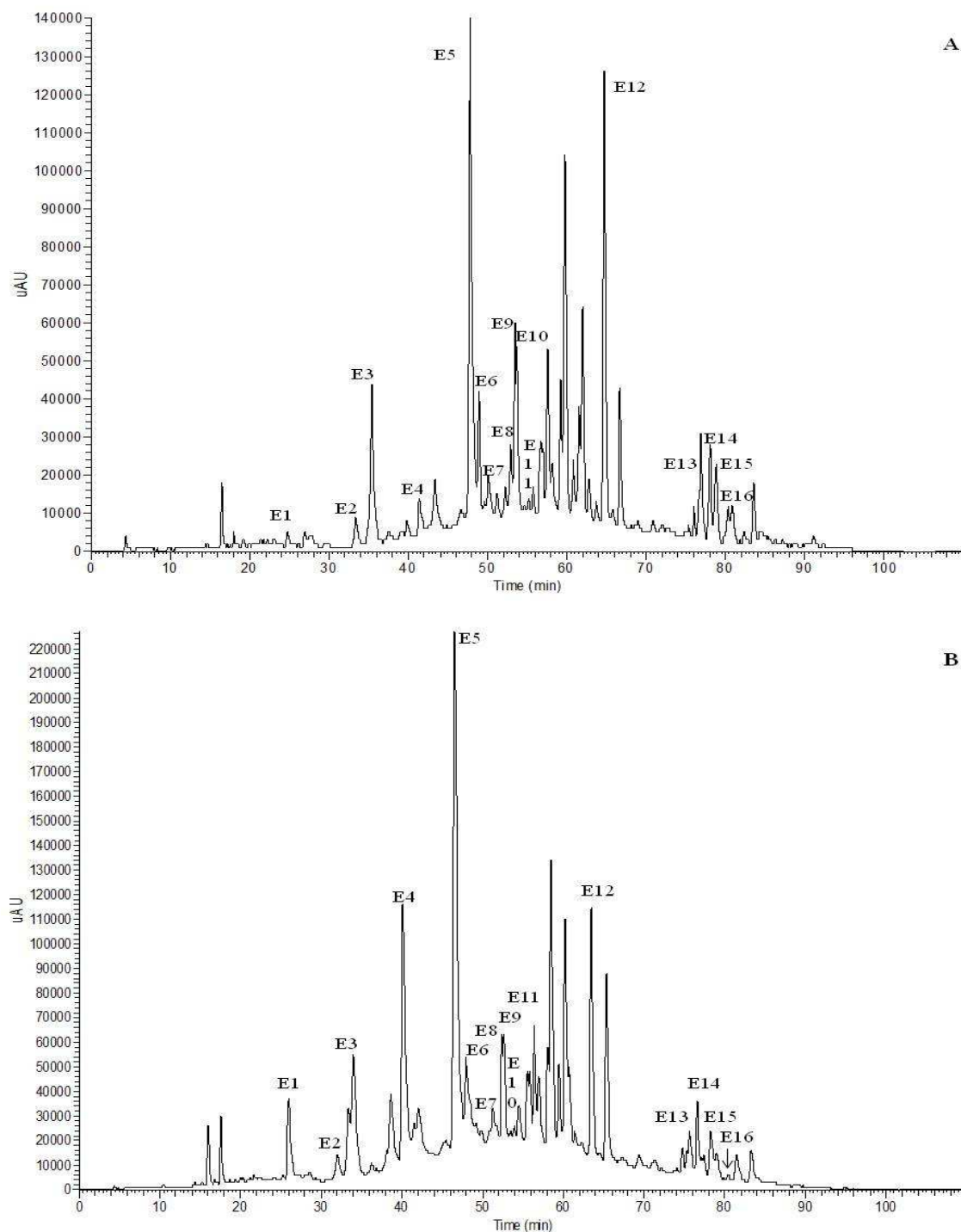


Figura 3. 36 – Cromatogramas de HPLC do chá preto Broken Leaf (Gorreana) (A) e do chá comercial preto English Breakfast (B) a 320 nm. Picos são: E1 - Ácido hidroxicinâmico - isómero do ácido clorogénico; E2 - Ácido hidroxicinâmico - isómero do ácido cumárico; E3 - Ácido hidroxicinâmico - isómero do ácido cumárico; E4 - Ácido hidroxicinâmico - isómero do ácido clorogénico; E5 - Ácido cumárico; E6 - Flavona glicosilada; E7 - Ácido hidroxicinâmico - isómero do ácido cumárico; E8 - Ácido hidroxicinâmico - isómero do ácido cumárico; E9 - Flavona glicosilada; E10 - Flavona glicosilada; E11 - Flavonol glicosilado – derivado do Campferol; E12 – Campferol; E13 – Campferol glicosilado; E14 – Flavonol acilado glicosilado; E15 – Flavonol acilado glicosilado; E16 – Flavonol acilado glicosilado.

A identificação dos compostos detectados a 320 nm foi feita essencialmente por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorvância dos compostos separados com os resultados com

idêntica informação obtida pela análise dos padrões em condições semelhantes à dos chás e com os resultados análogos encontrados na literatura (Tabela 3.27).

Tabela 3. 27 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes ao comprimento de onda de 320 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|--------------------------------|---|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| Ácidos hidroxicinâmicos | | | | |
| E1 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Clorogénico | 25,90 - 26,77 | 1,90 – 6,78 | 245, 325 |
| E2 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | 32,11 - 32,86 | 0,17 – 0,89 | 237, 314 |
| E3 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | 33,65 - 35,01 | 0,50 – 3,39 | 311 |
| E4 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Clorogénico | 39,93 - 41,03 | 2,49 – 17,48 | 246, 325 |
| E5 | ácido Cumárico* | 46,31 - 47,37 | 0,34 – 8,41 | 242, 309 |
| E7 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | 49,53 - 50,76 | 0,05 – 1,47 | 240, 307 |
| E8 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | 51,06 - 52,63 | 0,15 – 1,04 | 241, 310 |
| Flavonas | | | | |
| E6 | Flavona Glicosilada | 47,83 - 48,54 | 2,74 – 7,58 | 237, 272, 338 |
| E9 | Flavona Glicosilada | 51,95 - 53,16 | 2,15 – 5,25 | 237, 272, 338 |
| E10 | Flavona Glicosilada | 52,44 - 53,72 | 2,38 – 4,31 | 237, 272, 340 |
| Flavonóis | | | | |
| E11 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 54,44 - 55,48 | 1,95 – 4,08 | 238, 269, 350 |
| E12 | Campferol Glicosilado | 63,24 - 64,20 | 3,97 – 11,82 | 265, 346 |
| E13 | Flavonol Acilado Glicosilado | 75,48 - 76,22 | 2,85 – 4,26 | 266, 318 |
| E14 | Flavonol Acilado Glicosilado | 76,41 - 77,26 | 2,41 – 5,47 | 264, 318-320 |
| E15 | Flavonol Acilado Glicosilado | 77,22 - 78,05 | 2,41 – 3,84 | 267, 314-321 |
| E16 | Flavonol Acilado Glicosilado | 79,01 - 80,50 | 1,88 – 106,68 | 268, 317-320 |

*compostos identificados por comparação com padrões

Os picos E1 (tR entre 25,90 e 26,77 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 245 e 325 nm) e E4 (tR entre 39,93 e 41,03 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 246 e 325 nm) foram identificados como sendo um isómero do ácido clorogénico, uma vez que este composto apresenta um perfil cromatográfico e um $\lambda_{\text{máx}}$ semelhantes ao ácido clorogénico diferindo apenas nos tempos de retenção.

Os picos E2 (tR entre 32,11 e 32,86 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 237 e 314 nm), E3 (tR entre 33,65 e 35,01 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 311 nm), E7 (tR entre 49,53 e 50,76 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 240 e 307 nm) e E8 (tR entre 51,06 e 52,63 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 241 e 310 nm) apesar de apresentarem vários tempos de retenção, todos os compostos apresentam um espectro UV-VIS com bandas de absorção semelhante ao ácido cumárico, padrão autêntico.

O pico E5 (tR entre 46,31 e 47,37 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 242 e 309 nm) foi identificado como sendo o ácido cumárico. Esta identificação foi feita tendo por comparação com um padrão autêntico no que diz respeito ao tempo de retenção e ao espectro de UV-VIS.

Os picos E6, E9 e E10 foram identificados como sendo flavonas glicosiladas por comparação com a literatura. Estes compostos apresentam um perfil cromatográfico com tempos de retenção de 47,83 a 48,54 minutos, de 51,95 a 53,16 minutos e de 52,44 a 53,72 minutos, respectivamente e de $\lambda_{\text{máx}}$ de 237, 270 e 338 nm (Lin *et al.*, 2008).

Por comparação com a literatura (Lin *et al.*, 2008; Sakakibara *et al.*, 2003), os picos E11 e E12 foram identificados como sendo flavonóis glicosilados derivados do campferol, pois apresentavam $\lambda_{\text{máx}}$ 269 e 346-350 nm e os picos E13, E14, E15 e E16 identificados como sendo flavonóis glicosilados acilados. Estes compostos apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ de 266-268 e de 314-320 nm. A acilação dos flavonóis com ácidos hidroxicinâmicos altera a banda de 346-355 nm, como se poderá verificar na identificação a 360 nm, para comprimentos de onda mais baixos, de 314-320 nm (Olsen *et al.*, 2009).

Por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, das médias dos somatórios das áreas absolutas a 320 nm verifica-se que os chás dos Açores juntamente com o chá preto limão pela ordem Pekoe, Broken Leaf, Preto-limão, Moinha, Porto Formoso e Orange Pekoe, apresentam valores significativamente inferiores aos chás comerciais, com excepção do Earl Grey. No entanto, as concentrações (mg/L) de alguns destes compostos são equiparáveis às dos compostos identificados a 280 nm, conforme gráficos abaixo (figuras 3.37, 3.38 e 3.39), atingindo-se para um dos ácidos hidroxicinâmicos um valor de concentração máxima de quase 17,5 mg/L. O flavonol acilado glicosilado (E16) é muito abundante no o chá preto+canela+laranja, e dadas as concentrações atingidas pensa-se que seja um composto proveniente da canela, à semelhança com o cinamaldeído.

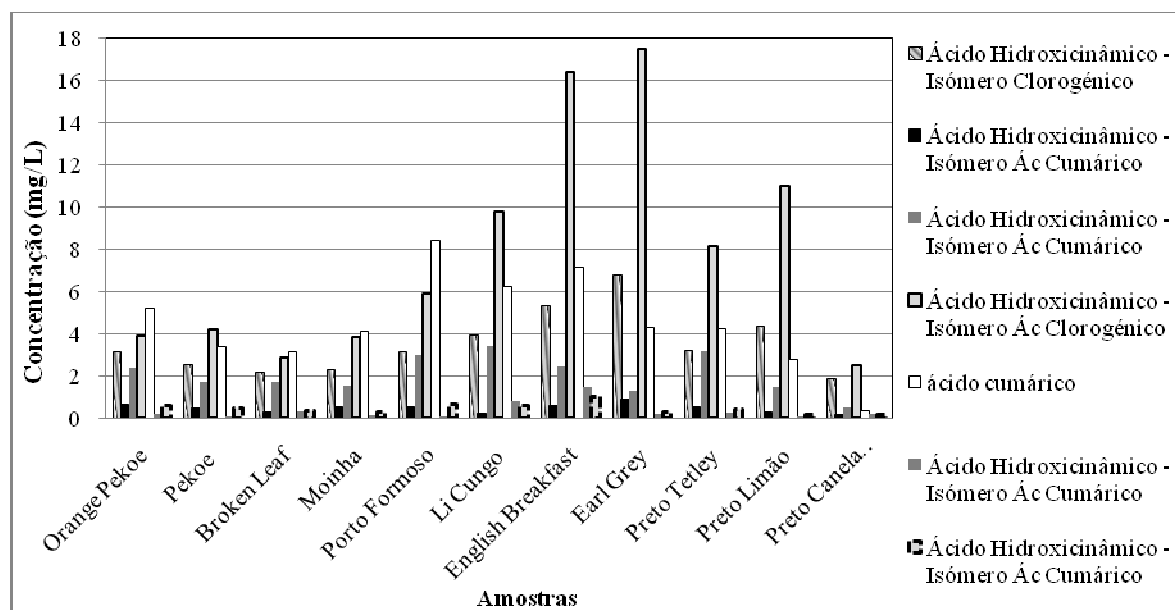


Figura 3. 37 – Gráficos das concentrações individuais dos ácidos hidroxicinâmicos (mg/L) em infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás pretos.

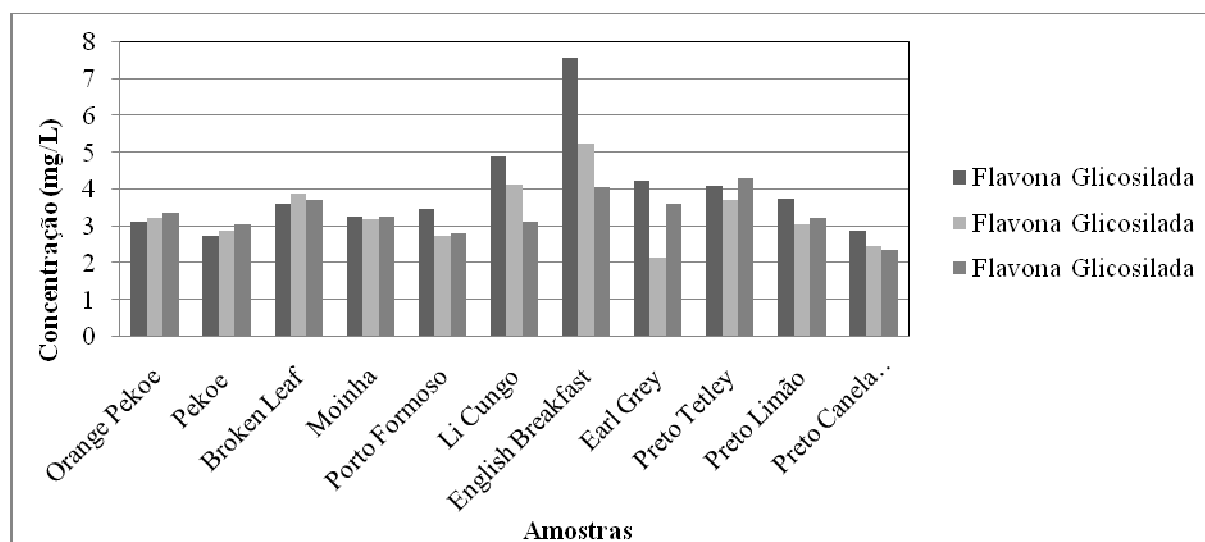


Figura 3. 38 – Gráficos das concentrações individuais das flavonas glicosiladas (mg/L) em infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás pretos.

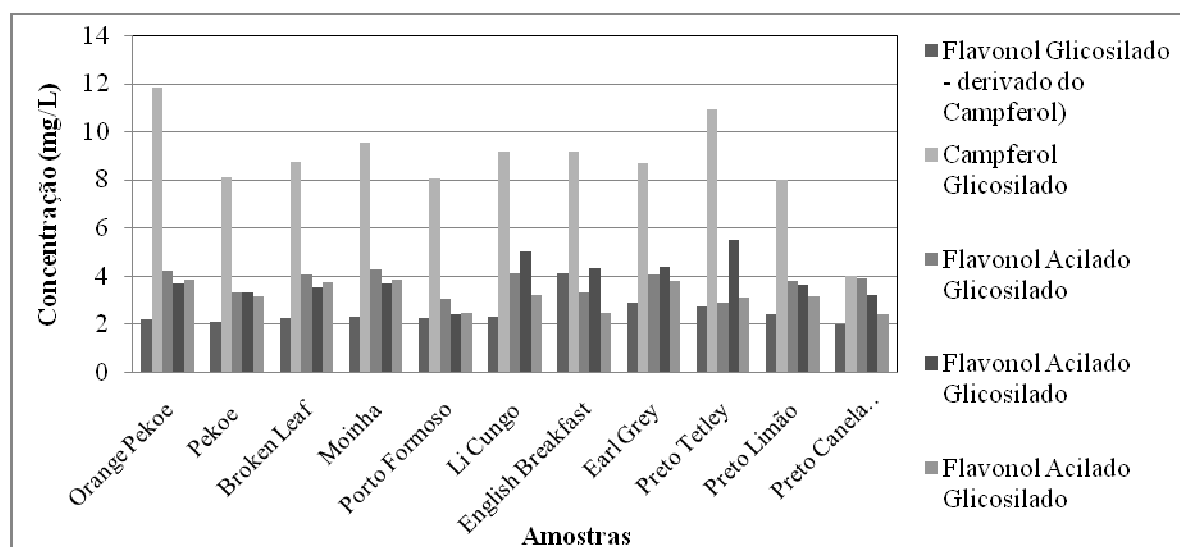


Figura 3. 39 – Gráficos das concentrações individuais dos flavonóis glicosilados e acilados glicosilados (mg/L) em infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás pretos

Dos ácidos hidroxicinâmicos identificados o mais abundante nos chás pretos é um isómero do ácido clorogénico (E4) cuja concentração é significativamente superior nos chás comerciais English Breakfast e Earl Grey com teores de 16,37 e 17,48 mg/L, respectivamente.

O segundo ácido mais abundante é outro isómero do ácido clorogénico (E1) que apresenta teores significativamente superiores de 5, 37 e de 6,78 mg/L nos chás comerciais English Breakfast e Earl Grey. Este composto (E1) é, juntamente com os compostos isómero ácido cumárico (E3) e ácido cumárico (E5), os que mais diferenciam os chás pretos.

O isómero do ácido cumárico (E3) apresenta teores significativamente inferiores para os chás preto+canela+laranja e Earl Grey e teores significativamente mais elevados para os chás Li-Cungo, Tetley e Porto Formoso.

O ácido cumárico apresenta teores significativamente inferiores para o chá preto+canela+laranja e significativamente mais elevados para os chás Porto Formoso, English Breakfast e Li-Cungo.

O Campferol Glicosilado (E12) é menos diferenciador que os compostos anteriores mas mesmo assim apresenta concentrações muito distintas nos vários chás. Este composto é significativamente superior no chá Orange Pekoe com um teor de 11,82 mg/L e significativamente inferior no chá preto+canela+laranja com um teor de 3,97 mg/L.

Para os outros compostos analisados a variabilidade da sua concentração nos vários chás é menor, no entanto, alguns deles podem ser diferenciadores de algumas variedades de chás pretos dos Açores. O campferol glicosilado identificado como E12 tem um teor significativamente superior para o chá Orange Pekoe, enquanto o flavonol acilado glicosilado (E13) apresenta teores superiores para o chá Moínha e o chá Orange Pekoe.

O flavonol acilado glicosilado (E15) apresenta teores significativamente superiores para a Moínha, Orange Pekoe, Earl Grey e Broken Leaf.

A presença destes compostos bioactivos nos chás pretos dos Açores em concentrações superiores às encontradas nos chás comerciais pode ser um factor de valorização pois tratam-se de compostos com actividade antioxidante específica muito elevada e com outras propriedades biológicas .

Os chás dos Açores apresentaram teores significativamente inferiores do somatório das áreas cromatográficas a 320 nm quando comparados com os chás comerciais simples.

Os chás dos Açores apresentam teores significativamente superiores dos isómeros do ácido cumárico (E2 e E3), de ácido cumárico (E5), da flavona glicosilada (E7) e do campferol glicosilado (E12), relativamente aos chás comerciais adicionados.

Correlacionando os compostos identificados ao comprimento de onda de 320 nm com as propriedades antioxidantes anteriormente determinadas (Tabela 3.28) verifica-se que a concentração do ácido hidroxicinâmico, isómero do ácido clorogénico (E4) está muito fortemente relacionada ($|r| > 0,9$) com a capacidade antioxidante (DPPH) e fortemente relacionada ($0,6 < |r| < 0,9$) com o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e o poder redutor férrico (FRAP), enquanto a concentração do outro isómero do ácido clorogénico (E1) está apenas fortemente correlacionada com os três testes antioxidantes mencionados.

Tabela 3. 28 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 320 nm nos chás pretos.

| Picos | Compostos | Folin | DPPH | FRAP |
|-------|---|---------|---------|---------|
| E1 | Acido Hidroxicinâmico_Isomero Ac. Clorogenico 1 | 0,676** | 0,807** | 0,686** |
| E2 | Acido Hidroxicinâmico_Isómero Ac. Cumarico 1 | 0,136 | 0,313 | 0,035 |
| E3 | Acido Hidroxicinâmico_Isómero Ac. Cumarico2 | 0,123 | 0,193 | -0,079 |
| E4 | Acido Hidroxicinâmico_Isomero Ac. Clorogenico2 | 0,770** | 0,901** | 0,693** |
| E5 | Acido Cumárico | 0,026 | 0,202 | -0,035 |
| E6 | FlavonaGlicosilada 1 | 0,493* | 0,656** | 0,324 |
| E7 | Acido Hidroxicinâmico_Isómero Ac. Cumarico 3 | 0,268 | 0,422 | 0,078 |
| E8 | AcidoHidroxicinâmico_Isómero Ac. Cumarico 4 | -0,051 | 0,138 | -0,141 |
| E9 | Flavona Glicosilada 2 | 0,114 | 0,256 | 0,008 |
| E10 | Flavona Glicosilada 3 | 0,302 | 0,443* | 0,177 |
| E11 | Flavonol Glicosilado_derivado Campferol 1 | 0,521* | 0,692** | 0,336 |
| E12 | Campferol Glicosilado | 0,023 | 0,156 | 0,018 |
| E13 | Flavonol Acilado Glicosilado 1 | -0,232 | -0,248 | 0,052 |
| E14 | Flavonol Acilado Glicosilado 2 | 0,631** | 0,664** | 0,259 |
| E15 | Flavonol Acilado Glicosilado 3 | -0,207 | -0,103 | 0,038 |
| E16 | Flavonol Acilado Glicosilado 4 | -0,074 | -0,320 | -0,274 |

** Correlação com uma significância ao nível de 0,01; * Correlação com uma significância ao nível de 0,05

Com o teor de fenólicos totais estão ainda fortemente relacionadas ($0,6 < |r| < 0,9$) o flavonol glicosilado (E11) e o flavonol acilado glicosilado (E14). Estes dois últimos compostos, juntamente com a flavona glicosilada (E6) estão fortemente relacionados com a capacidade antioxidante (DPPH[•]).

Estes resultados destacam o papel destes grupos funcionais (ácidos hidroxycinâmicos e flavonóis) na actividade antioxidante dos chás pretos não só pela sua actividade específica mas também porque o seu contributo para a bioactividade se torna mais relevante dado menor teor de catequinas nestes chás relativamente aos chás verdes.

Considerando a média dos grupos de compostos identificados, a 320 nm, em todos os chás pretos analisados verifica-se que a composição média nas infusões de 15 minutos destes chás tem como compostos maioritários os ácidos hidroxycinâmicos, no entanto, a distribuição destes grupos de compostos não é igual para todos os chás pretos analisados destacando-se o chá Porto Formoso no grupo dos chás dos Açores e o chá Earl Grey no grupo dos chás comerciais (figura 3.40).

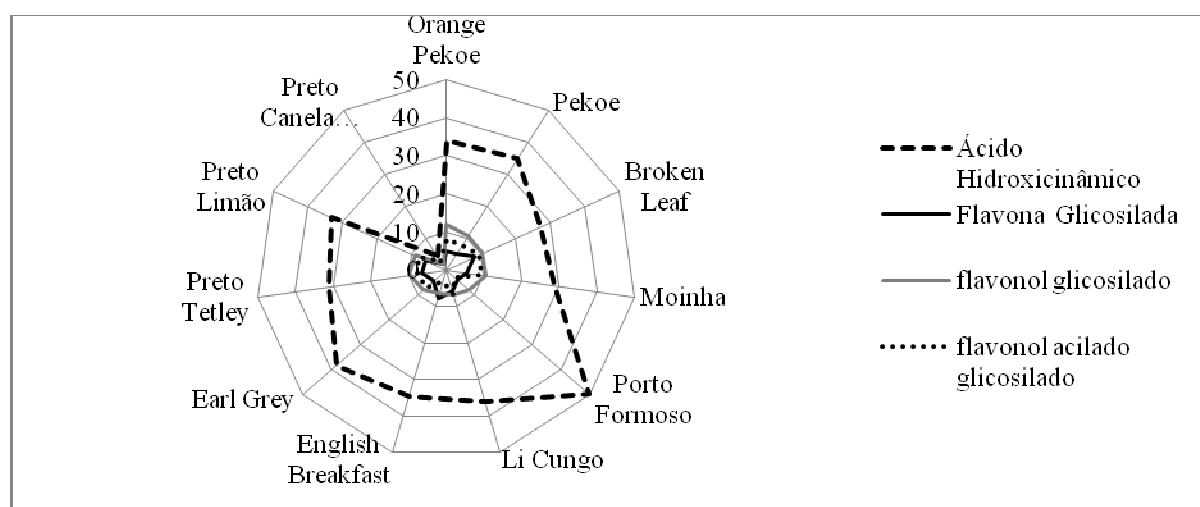


Figura 3. 40 – Teores médios (%) de ácidos hidroxycinâmicos, flavonas glicosiladas, flavonóis glicosilados e flavonóis acilados glicosilados identificados em cada tipo de chá preto nas respectivas infusões de 15 minutos.

- Análise a 360 nm

A Figura 3.41 ilustra os perfis cromatográficos em HPLC ao comprimento de onda de 360 nm de dois chás pretos, nomeadamente, o chá Broken Leaf (Gorreana) e o chá preto comercial, o chá English Breakfast.

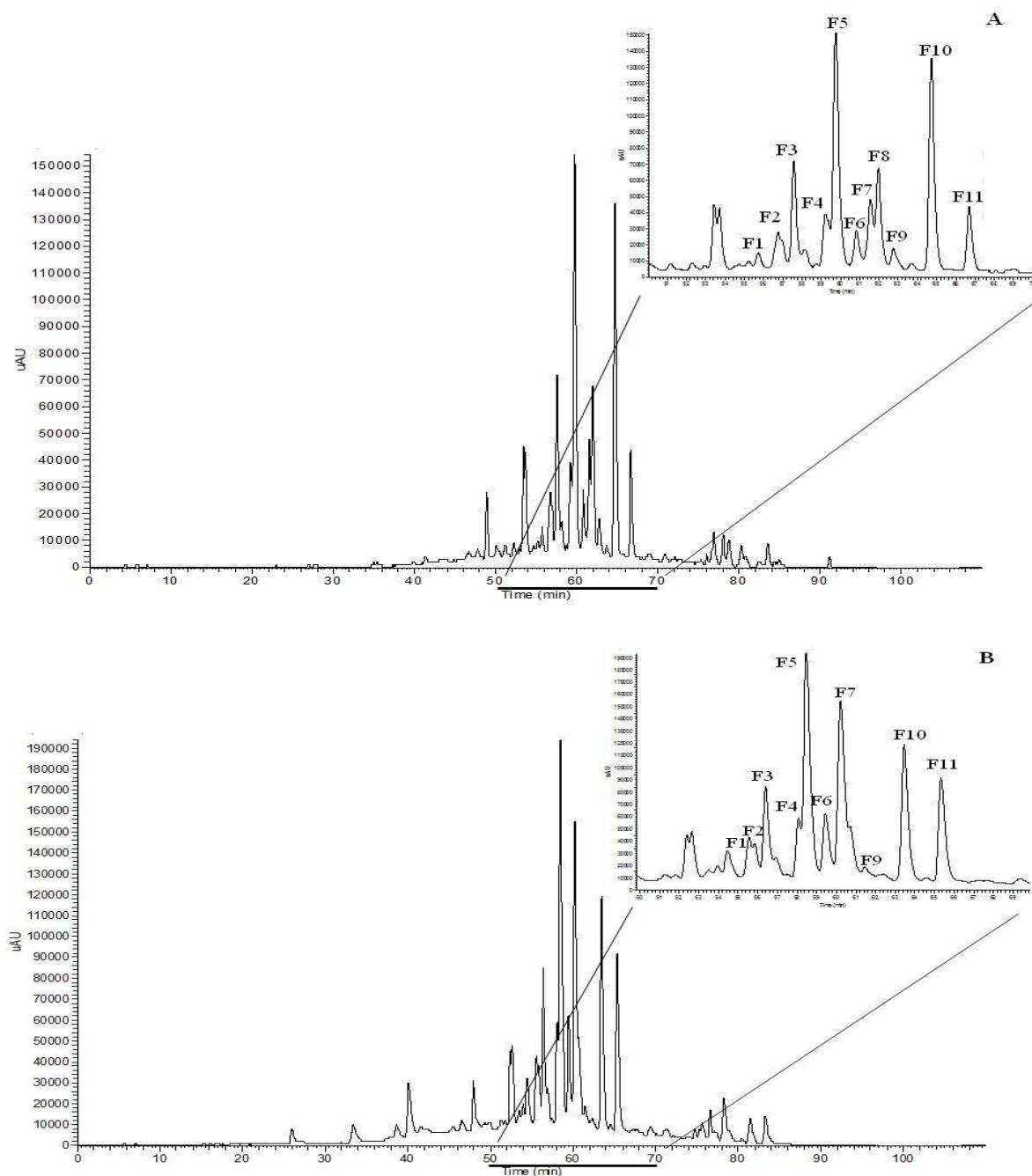


Figura 3. 41 – Cromatogramas de HPLC do chá preto Broken Leaf (Gorreana) (A) e do chá comercial preto English Breakfast (B) a 360 nm. Picos são: F1 - quercetina glicosilada; F2 - flavonol glicosilado - derivado do campferol; F3 - quercetina glicosilada; F4 - campferol glicosilado; F5 – isoquercitrina; F6 - flavonol glicosilado - miricetina glicosilada; F7 - flavonol glicosilado - miricetina glicosilada; F8 - flavonol glicosilado - derivado do campferol; F9 - flavonol glicosilado - derivado do campferol; F10 - flavonol glicosilado - derivado do campferol; F11 - campferol glicosilado.

Os compostos identificados a este comprimento de onda são listados na tabela 3.29. A identificação dos compostos detectados foi feita essencialmente por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de absorvância dos compostos separados com resultados análogos encontrados na literatura (Lin *et al.*, 2008; Sakakibara *et al.*, 2003), uma vez que não se dispunham de padrões adequados.

Tabela 3. 29 - Compostos tentativamente identificados em infusões de 15 minutos de chás pretos ao comprimento de onda de 360 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|------|---|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Flavonóis | | | |
| F1 | flavonol glicosilado - derivado da Quercetina | 55,54 – 55,87 | 1,88 – 4,23 | 234, 258, 356 |
| F2 | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 55,69 – 56,43 | 1,88 – 6,00 | 237, 265, 347 |
| F3 | flavonol glicosilado - derivado da Quercetina | 56,23 – 57,11 | 2,84 – 6,67 | 235, 256, 357 |
| F4 | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 57,53 – 58,72 | 1,88 – 4,33 | 257, 347 |
| F5 | Isoquercitrina* | 58,40 – 59,17 | 0,35 – 20,88 | 237, 256, 355 |
| F6 | flavonol glicosilado - miricetina glicosilada | 58,50 – 60,15 | 3,08 – 14,56 | 236, 266, 356 |
| F7 | flavonol glicosilado - miricetina glicosilada | 59,42 – 60,94 | 2,75 – 10,75 | 235, 262, 356 |
| F8 | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 60,11 – 61,44 | 1,88 – 15,88 | 266, 346 |
| F9 | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 61,34 – 62,26 | 1,88 – 7,53 | 264, 352 |
| F10 | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 63,24 – 64,20 | 4,18 – 13,02 | 238, 265, 348 |
| F11 | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 65,10 – 66,14 | 3,66 – 8,14 | 238, 265, 350 |

*composto identificado por comparação com padrões

Apesar de praticamente todos os picos serem identificados como flavonóis glicosilados, estes foram indicados como sendo derivados de compostos diferentes devido ao perfil do espectro e aos comprimentos de onda dos máximos de absorção evidenciados no espectro UV-VIS.

Os picos F1 e F3 foram definidos como sendo derivados da quercetina por apresentarem $\lambda_{\text{máx}}$ a 237, 256 e 356 nm, enquanto os picos F2, F4, F8, F9, F10 e F 11 foram identificados como sendo derivados do campferol por estes compostos apresentarem $\lambda_{\text{máx}}$ a 234-238, 265-266 e 346-356 nm. Estes picos identificados apresentam entre eles diferentes tempos de retenção na coluna.

O pico F5 (tR entre 58,40 e 59,17 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 237, 256 e 355 nm) foi identificado como isoquercitrina tendo como base o tempo de retenção e o espectro de UV-VIS, por comparação com um padrão cromatográfico. A isoquercitrina é um flavonol glicosilado, derivado da quercetina, para o qual estão descritos efeitos positivos na regulação do metabolismo dos açúcares e portanto poderá contribuir para moderar os efeitos da diabetes (Sakai *et al.*, 2001).

Os picos F6 e F7 foram identificados como sendo derivados da miricetina, por comparação com dados da literatura (Lin *et al.*, 2008) por estes compostos apresentarem $\lambda_{\text{máx}}$ a 235-236, 262-266 e 356 nm. Estes picos identificados apresentam entre eles diferentes tempos de retenção na coluna.

Os flavonóis quercetina, campferol e miricetina promovem a inibição do factor de crescimento de hepatócitos prevenindo a migração celular no medulablastoma, tumor cerebral maligno mais comum nas crianças (Labbé *et al.*, 2009).

Por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, das médias dos somatórios das áreas absolutas a 360 nm verifica-se que os chás pretos dos Açores apresentam teores dos compostos detectados a este

comprimento de onda que são significativamente superiores ao chá preto+canela+laranja e significativamente inferiores aos chás Tetley e Li-Cungo.

A distribuição dos compostos identificados a 360 nm encontra-se representada nas figuras abaixo (3.42 e 3.43).

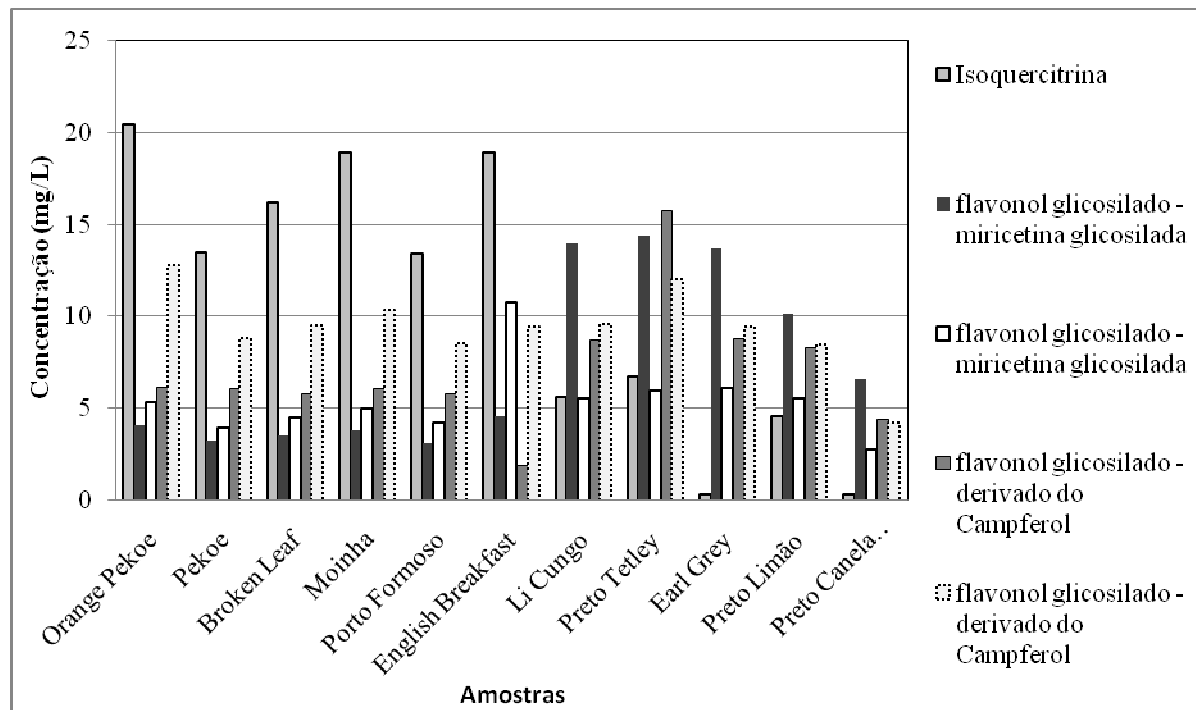


Figura 3. 42 – Concentrações individuais (mg/L), dos componentes identificados a 360 nm e que estão presentes em concentrações superiores a 10 mg/L.

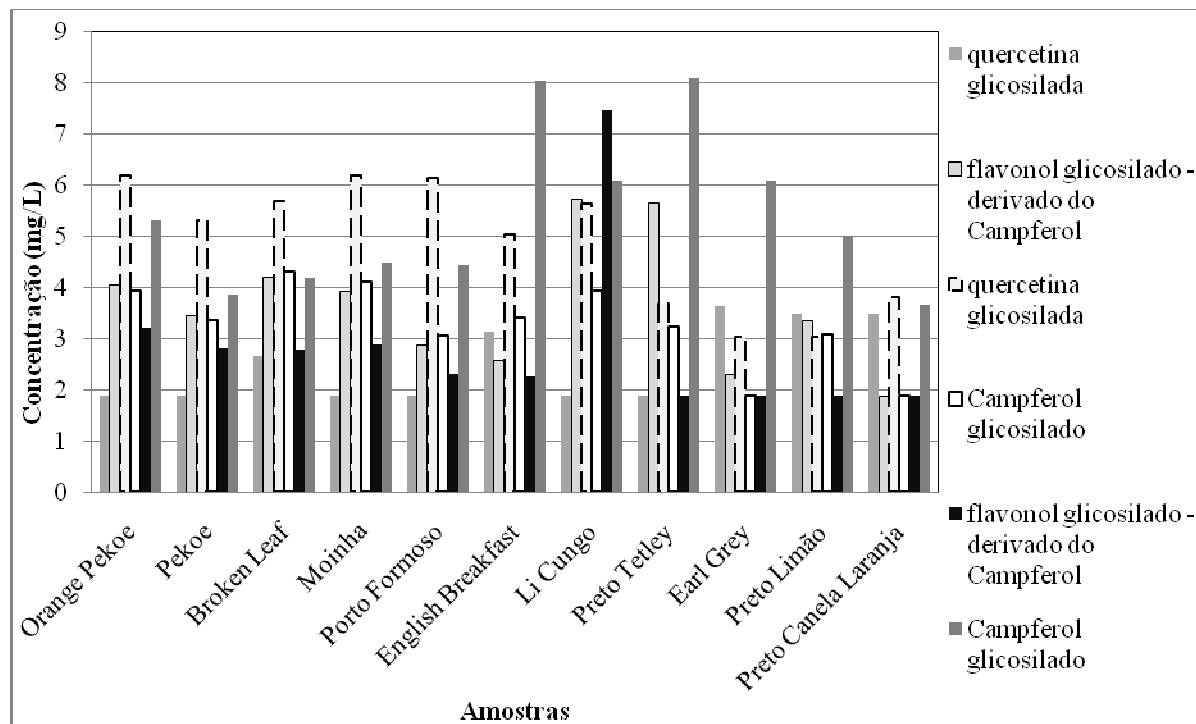


Figura 3. 43 – Concentrações individuais (mg/L), dos componentes identificados a 360 nm e presentes em concentrações inferiores a 10 mg/L

Nos chás pretos analisados neste trabalho a isoquercitrina (F5), é o composto maioritário de entre os detectados a 360 nm atingindo a concentração de 20,43 mg/L no chá Orange Pekoe. No entanto a sua distribuição não é homogênea uma vez que a sua gama de concentração é de 0,35 mg/l e 20,43 mg/L. Exactamente devido a estas diferenças a isoquercitrina é o componente que melhor diferencia os chás pretos analisados. Para este composto verifica-se que os chás dos Açores apresentam teores significativamente superiores a todos os chás comerciais com a excepção do chá English Breakfast.

Com uma capacidade de diferenciação dos chás um pouco menores temos dois flavonóis glicosilados, um derivado da miricetina (F6) e o outro derivado do campferol (F11). Em relação ao pico F6, os vários chás dos Açores, apresentam teores significativamente inferiores a todos os chás comerciais. A única excepção verifica-se com o chá Orange Pekoe, o qual apresenta o teor mais elevado em relação aos chás dos Açores mas significativamente inferior a todos os chás comerciais (simples ou adicionados) excluindo o chá English Breakfast, em relação ao qual não apresenta diferenças. No que respeita a composto identificado em F11 este apresenta teores significativamente superiores para os chás Tetley e English Breakfast e teores significativamente inferiores para os chás preto+canela+laranja e Pekoe.

Verifica-se ainda que o flavonol glicosilado - derivado da quercetina (F3) apresenta teores superiores para os chás Orange Pekoe, Moinha, Porto Formoso, e Broken Leaf em relação aos outros chás analisados. Para o flavonol glicosilado - derivado do campferol (F4) os chás Broken Leaf, Moinha e Orange Pekoe, juntamente com o Li-Cungo, apresentam teores significamente mais elevados. Outro flavonol glicosilado - derivado do campferol, identificado como P9 apresenta no chá Li-Cungo o teor significativamente superior aos outros chás, no entanto este é seguido de um grupo de chás formado pelos chás Orange Pekoe, Moinha, Pekoe e Broken Leaf os quais são significativamente superiores aos restantes chás. Verifica-se ainda que o chá Orange Pekoe apresenta o teor significativamente superior de flavonol glicosilado - derivado do campferol (P10) em relação aos vários chás analisados.

Os chás dos Açores apresentaram teores significativamente superiores do flavonol glicosilado, derivado da quercitina (F3) e de isoquercitrina (F5), em relação aos chás comerciais simples e adicionados; por outro lado o flavonol glicosilado, derivado da miricetina (F6) foi mais abundante nos chás comerciais.

Os chás dos Açores apresentam teores significativamente superiores de flavonóis glicosilados, derivados da quercetina (F1) e do campferol (F4 e F10), em relação aos chás comerciais adicionados, e teores significativamente inferiores de outros flavonóis glicosilados, derivados da miricetina (F7) e de campferol (F11), em relação aos chás comerciais simples.

Correlacionando os compostos identificados a este comprimento de onda (360 nm) com as propriedades antioxidantes anteriormente determinadas (Tabela 3.30) verifica-se as concentrações dos flavonóis glicosilados, derivado da quercitina (F3) e derivado da miricetina (F6) estão fortemente correlacionadas ($0,6 < |r| < 0,9$) com o teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), com a capacidade antiradicalar (DPPH[•]) e com o poder redutor férrico (FRAP), o que é uma indicação da sua actividade antioxidante específica.

Tabela 3. 30 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os compostos identificados a 360 nm nos chás pretos.

| Picos | Compostos | Folin | DPPH | FRAP |
|-------|--|----------|----------|----------|
| F1 | Flavonol glicosilado - derivado da Quercitina | 0,424* | 0,371 | 0,563** |
| F2 | Flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 0,047 | 0,050 | -0,090 |
| F3 | Flavonol glicosilado - derivado da Quercitina | -0,748** | -0,615** | -0,653** |
| F4 | Flavonol glicosilado - derivado do Campferol | -0,432* | -0,298 | -0,244 |
| F5 | Isoquercitrina | -0,585** | -0,406 | -0,423* |
| F6 | Flavonol glicosilado - miricetina glicosilada | 0,790** | 0,701** | 0,522* |
| F7 | Flavonol glicosilado - miricetina glicosilada | 0,491* | 0,667** | 0,384 |
| F8 | Flavonol l glicosilado - derivado do Campferol | 0,468* | 0,373 | 0,207 |
| F9 | Flavonol glicosilado - derivado do Campferol | -0,093 | -0,047 | -0,104 |
| F10 | Flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 0,005 | 0,132 | -0,005 |
| F11 | Flavonol glicosilado - derivado do Campferol | 0,679** | 0,753** | 0,312 |

** Correlação com uma significância ao nível de 0,01; * Correlação com uma significância ao nível de 0,05

A concentração do flavonol glicosilado, derivado do campferol (F11) apenas está fortemente relacionada com o teor de fenólicos totais e com a capacidade antioxidante. Verifica-se ainda que o flavonol glicosilado, derivado do campferol (F4) e a isoquercitrina (F5) estão fortemente relacionados com o teor de fenólicos totais, que o flavonol glicosilado, derivado da miricetina (F7) está fortemente relacionado com a capacidade antioxidante e que o o flavonol glicosilado, derivado do campferol (F1) está fortemente relacionado com o poder redutor férrico. Assim, F3, F4, F5, F6 e F11 estão fortemente relacionados com o teor de fenólicos totais, F3, F6, F7 e F11 estão fortemente relacionados com a capacidade antioxidante e F1, F3 e F6 estão fortemente relacionados com o poder redutor férrico. Estes resultados confirmam que apesar de todos os compostos fenólicos detectados nas infusões de chá apresentarem actividade antioxidante as suas características estruturais específicas tornam-nos mais aptos a reagir com alguns tipos específicos de agentes oxidantes.

Para cada comprimento de onda (λ) analisado, verifica-se que existe uma série de compostos que não foram identificados por estarem em concentrações muito pequenas. Comparando os vários comprimentos de onda entre eles verifica-se que existem compostos identificados em mais que um dos comprimentos de onda analisados, tendo sido quantificados nos comprimentos de onda aos quais apresentavam maior área cromatográfica.

Quando se analisa o conjunto dos compostos identificados nas infusões de 15 minutos preparadas a partir de chás pretos verifica-se que as concentrações relativas de cada família de compostos são diferentes para os vários tipos de chá (Figura 3.44).

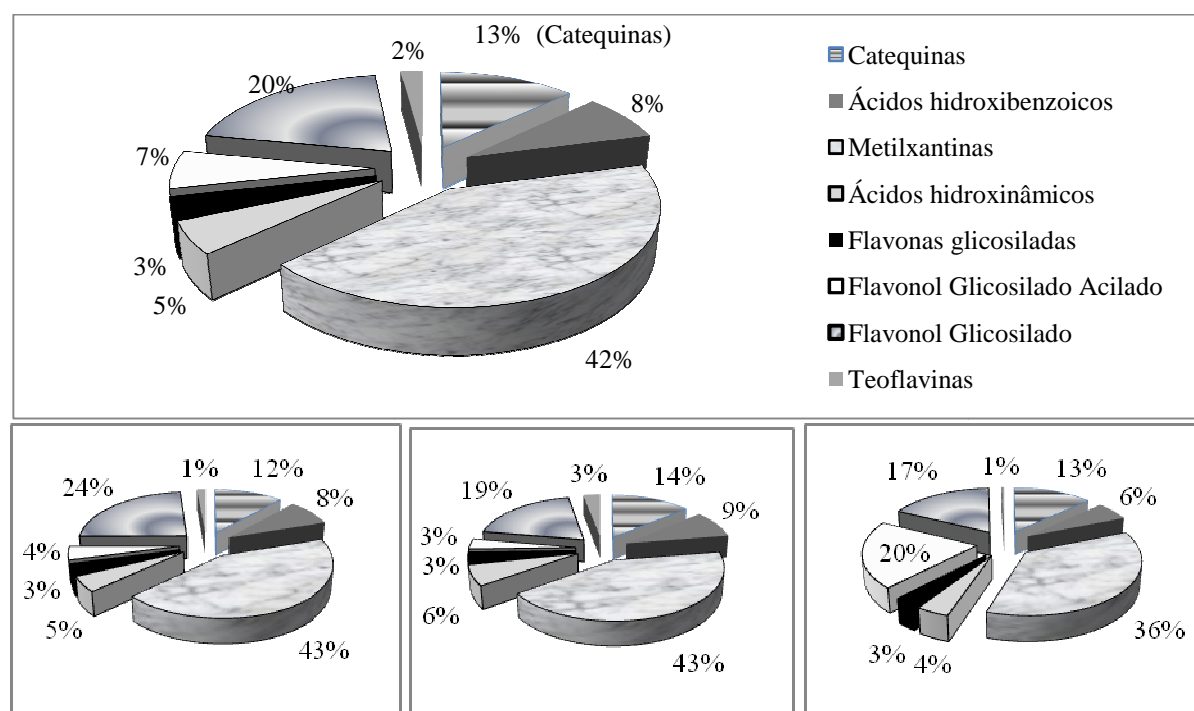


Figura 3. 44 - Concentração média (%) dos compostos identificados nas infusões de 15 min preparadas a partir de chás pretos (em cima: chás analisados; em baixo da esquerda para a direita: Açores; comerciais; e comerciais adicionados).

Verifica-se que os chás verdes dos Açores são aqueles que apresentam uma menor percentagem de catequinas (11,6%) o que pode conferir a estes chás um saber mais agradável, uma vez que, como foi referido anteriormente, as catequinas são compostos que contribuem para o sabor amargo e adstringente do chá (Balentine *et al.*, 1997; Reto *et al.*, 2007).

Verifica-se ainda que os chás pretos dos Açores são aqueles que apresentam uma maior percentagem de metilxantinas (43,2%) um pouco acima dos chás comerciais simples (42,6%), que na sua maioria é a cafeína. Nos humanos a cafeína estimula o coração, o sistema nervoso central e o sistema respiratório. É também diurética e tem o efeito de retardar a fadiga (Rahim *et al.*, 2014). Apresentam ainda uma maior percentagem de flavonóis glicosilados (21%).

Comparando os chás verdes e pretos verifica-se que existem diferenças na composição das infusões de 15 minutos preparadas (Tabela 3.31).

Tabela 3. 31 - Teor dos compostos identificados em infusões de 15 minutos de chás verdes e pretos expressos em mg/L e em %.

| Grupo de compostos | Chá verde | | Chá preto | |
|------------------------------|-----------|------|-----------|------|
| | mg/L | % | mg/L | % |
| Catequinas | 472,32 | 61,2 | 45,76 | 12,9 |
| Ácidos hidroxibenzoicos | 24,98 | 3,2 | 28,60 | 8,1 |
| Metilxantinas | 166,42 | 21,6 | 149,72 | 42,2 |
| Ácidos hidroxicinâmicos | 18,77 | 2,4 | 19,17 | 5,4 |
| Flavonas glicosiladas | 22,61 | 2,9 | 10,68 | 3,0 |
| Flavonol glicosilado acilado | 10,25 | 1,3 | 22,75 | 6,4 |
| Flavonol glicosilado | 56,54 | 7,3 | 62,08 | 20,0 |
| Teoflavinas | -- | -- | 6,99 | 2,0 |

O chá verde é especialmente rico em polifenóis, flavonóides e catequinas, enquanto o chá preto tem quantidades menores (Miean & Mohamed, 2000).

Verifica-se que, para os chás verdes, os constituintes bioativos mais abundantes são as catequinas, com um teor médio dos chás analisados de 472,32 mg/L, seguido das metilxantinas, com 166,42 mg/L, e dos ácidos fenólicos com 24,98 mg/L para os ácidos hidroxibenzóicos, e 18,77 mg/L para os ácidos hidroxicinâmicos. Estes resultados são coerentes com outros estudos realizados (Komes *et al.*, 2010; Reto *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2000).

Nos chás pretos foi identificado um menor número de catequinas, em concentrações mais de dez vezes inferiores às presentes nos chás verdes. Como foi referido, as catequinas são alteradas durante o processo de fermentação do chá para formarem teoflavinas e teorrubiginas (Wang *et al.*, 2000). O mesmo sucede com as flavonas glicosiladas cujo teor diminui 47%.

Comparando os resultados obtidos para os chás verdes e pretos verifica-se que, apesar destes chás serem produzidos a partir da mesma planta, o conteúdo das metilxantinas nos chás verdes é superior ao dos chás pretos (11%), o que é referido noutros estudos (Kim *et al.*, 2011; Del Rio *et al.*, 2004); uma tendência contrária foi encontrada por outros autores que compararam concentrações de metilxantinas e concluíram que os conteúdos de cafeína e teobromina foram maiores nos chás pretos do que nos chás verdes por eles estudados (Cabrera *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003). Sendo os chás produzidos a partir de uma mesma planta (*Camellia sinensis*) um maior teor de cafeína e teobromina nos chás pretos pode resultar da sua mobilização durante o processo de fermentação, tornando mais fácil a sua extracção da matriz ou por características da própria folha relacionadas com a variedade vegetal (diferença geográfica), a idade da folha e a sua qualidade.

Os flavonóis, por sua vez, apresentam-se também numa forma maioritariamente glicosilada com um teor superior nos chás pretos. Estes factos indicam-nos que os flavonóis são resistentes ao processo de fermentação e que as flavonas glicosiladas são mais resistentes que as catequinas. As formas glicosiladas dos compostos fenólicos têm grande relevância biológica pois diversos estudos têm mostrado que são mais facilmente absorvidas do que as respectivas agliconas; um exemplo é a melhor absorção glucósidos de quercetina relativamente à aglicona quercetina (Manach *et al.*, 2005; Hollman & Katan, 1999).

Os ácidos hidroxibenzóicos como o ácido gálico e ácido protocatecuico são encontrados em muito poucas plantas consumidas pelos seres humanos.

Ao contrário dos ácidos hidroxibenzóicos, os ácidos hidroxicinâmicos são um grupo de compostos altamente abundantes nos alimentos que podem ser responsáveis por cerca de um terço dos compostos fenólicos na nossa dieta. Estes ganharam um interesse crescente na saúde, porque eles são conhecidos por serem potentes antioxidantes (Teixeira *et al.*, 2013). Os ácidos cumárico, caféico e ferúlico são derivados hidroxicinâmicos e raramente encontrados na forma livre. Existem principalmente na forma conjugada com mono ou polissacáridos, ligados a um ou mais dos grupos fenólicos, mas podem também ocorrer como derivados funcionais, tais como os ésteres e os ésteres metílicos (Tahira *et al.*, 2011).

As teoflavinas foram detectadas nos chás pretos (2%) mas não nos chás verdes (Del Rio *et al.*, 2004), talvez porque o seu teor nos chás verdes é muito baixo (Yashin *et al.*, 2011) estando abaixo dos limiares analíticos da análise por HPLC. Estudos sugerem que as teoflavinas têm efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular podendo contribuir para a redução do colesterol no sangue (Vermeer *et al.*, 2008).

Quer nos chás verdes, quer nos chás pretos não foi detectada a catequina a que pode ser causado, possivelmente, por uma separação incompleta dos compostos fenólicos na coluna de HPLC.

A comparação dos resultados é por vezes difícil devido à falta de uniformidade nas condições utilizadas para preparar as infusões. A quantidade de folhas a serem utilizadas por quantidade de água (razão chá: água) é de grande importância. No entanto, existem outros factores a considerar como a temperatura e o tempo de infusão (Reto *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2003).

O mecanismo de dissolução dos compostos solúveis em água depende ainda da forma como se apresentam as amostras. Um estudo realizado (Komes *et al.*, 2010) mostra que, para um mesmo tempo de infusão 15 min, existe maior dissolução, quando temos saco de chá em relação às folhas soltas, 27% de catequinas, de 19% de metilxantinas e de 140% de ácidos fenólicos.

A actividade antioxidante especificados flavonóides (quercetina, miricetina, campferol) é considerada superior à das catequinas (Porgali *et al.*, 2012). A actividade antioxidante do ácido hidroxibenzóico depende do número de grupos hidroxilo na molécula (Rice-Evans *et al.*, 1996), enquanto para os ácidos hidroxicinâmicos, é a presença de grupos metoxilo que parece influenciar mais positivamente a sua actividade (Porgali *et al.*, 2012).

As teoflavinas no chá preto e as catequinas no chá verde são antioxidantes igualmente eficazes (Stewart *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2001), mas a sua concentração nesses matrizes é distinta o que explica os valores geralmente superiores da actividade antioxidante do chá verde relativamente ao chá preto.

Os teores das catequinas, do ácido gálico e das metilxantinas têm sido considerados como factores diferenciadores dos chás de acordo com suas origens geográficas (Cabrera *et al.*, 2003).

Os flavonóis e as flavonas identificadas neste trabalho encontram-se na forma glicosilada, uma vez que os glicosídeos são quimicamente mais estáveis e solúveis em água, e mais fáceis de ser armazenado no espaço aquoso da célula da planta (planta do chá) (Cheong *et al.*, 2005).

Os flavonóis ocorrem nas plantas, e nomeadamente na planta do chá, *Camellia sinensis*, como complexos conjugados, com um a cinco açúcares ligados à aglicona, e muitas vezes são acilados com ácidos hidroxicinâmicos (Olsen *et al.*, 2009)

Comparando o grupo dos chás verdes com o grupo dos chás pretos quanto aos somatórios das áreas dos picos detectados a 280 nm verifica-se que existem três grupos homogéneos: um primeiro grupo são os chás pretos dos Açores, o segundo compreende os chás pretos comerciais (simples e adicionados) e os chás verdes dos Açores e no terceiro grupo estão os chás verdes comerciais (simples e adicionados) (Tabela 3.32).

Tabela 3. 32 - Médias dos somatórios das áreas cromatográficas a 280 nm, 320 nm e 360 nm nos chás verdes e pretos analisados.

| Infusões | Somatório a 280 | Somatório a 320 | Somatório a 360 |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Chá Preto dos Açores | 86739174 ^a | 25049089 ^a | 16940095 ^{ab} |
| Chá Preto Comercial | 121931240 ^b | 37290606 ^b | 23031125 ^{bc} |
| Chá Preto Comercial Adicionado | 133446671 ^b | 34390320 ^{ab} | 12427695 ^a |
| Chá Verde dos Açores | 137618227 ^b | 36815478 ^b | 24876030 ^c |
| Chá Verde Comercial | 184671673 ^c | 34051716 ^{ab} | 22798757 ^{bc} |
| Chá Verde Comercial Adicionado | 190264975 ^c | 39562008 ^b | 26973651 ^c |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey, para cada tipo de somatório

Por análise dos somatórios das áreas a 320 nm verificamos que os chás pretos dos Açores são significativamente diferentes dos chás verdes (Açores e comerciais adicionados) no que se refere a este parâmetro.

A 360 nm os chás pretos dos Açores e os chás comerciais simples (verdes e pretos) não apresentam diferenças significativas, no entanto, os chás comerciais adicionados apresentam diferenças significativas entre o verde e o preto, tendo o chá verde adicionado o somatório de áreas cromatográficas a 360 nm significativamente superior ao chá preto adicionado. Os chás verdes dos Açores e os chás verdes adicionados são também significativamente superiores dos chás pretos dos Açores.

O teor de fenólicos e a capacidade antiradicalar estão moderadamente correlacionados com os somatórios das áreas determinadas a 320 nm e a 360 nm e fortemente correlacionados com o somatório das áreas determinadas a 280 nm. O poder redutor férrico está fortemente correlacionado com o somatório das áreas a 280 nm e moderadamente correlacionado com o somatório das áreas a 360 nm.

Tabela 3. 33 - Correlação de Pearson entre as propriedades antioxidantes e os somatórios das áreas determinadas a 280 nm, 320 nm e a 360 nm dos chás

| | Fenólicos totais | DPPH | FRAP |
|---------------------------|-------------------------|-------------|-------------|
| Somatório a 280 nm | 0,811** | 0,801** | 0,703** |
| Somatório a 320 nm | 0,406* | 0,356* | 0,276 |
| Somatório a 360 nm | 0,543* | 0,587* | 0,494* |

** Correlação com uma significância ao nível de 0,01; * Correlação com uma significância ao nível de 0,05

As correlações com os compostos determinados a 280 nm são expectáveis pois são os compostos fenólicos mais abundantes nas amostras. Por outro lado, as correlações mais fortes das concentrações de flavonóis glicosilados detectados a 360 nm, com a actividade antioxidante, apesar da baixa concentração destes compostos no chá, evidenciam a sua actividade específica.

A actividade antioxidante dos compostos fenólicos, nomeadamente dos ácidos hidroxibenzóicos, depende dos números e posições dos grupos hidroxilo em relação ao grupo funcional carboxilo e aumenta com o aumento do grau de hidroxilação, como é um exemplo o ácido gálico tri-hidroxilado, que mostra uma alta actividade antioxidante (Tahira *et al.*, 2011).

Pelos resultados obtidos, pode-se dizer que os chás verdes contêm maior quantidade de compostos fenólicos e flavonóides, o que significa que o tipo de tratamento a que a planta é sujeita influencia a sua composição química (Ferrara *et al.*, 2001; Almajano *et al.*, 2008).

Estudos existem (Soobrattee *et al.*, 2005) que indicam que a actividade antioxidante varia na seguinte ordem: dímero de procianidina > flavanóis > flavonóis > ácidos hidroxicinâmicos > ácidos fenólicos simples. Entre os flavonóides agliconas, as capacidades antioxidantes diminuem na ordem quercetina, miricetina e campferol. O ácido gálico e ácido rosmarínico foram os antioxidantes mais potentes entre os compostos fenólicos simples e ácidos hidroxicinâmicos, respectivamente. Actividades antioxidantes menores foram observadas para as flavonas, as flavanonas e as isoflavonas (Soobrattee *et al.*, 2005).

No total, uma mistura complexa de compostos fenólicos contribuem com as suas actividades antioxidantes específicas para a actividade total das infusões de chás.

A principal hipótese dos efeitos benéficos para a saúde do chá, está associada com as suas propriedades antioxidantes (Higdon & Frei, 2003). A combinação seleccionada de extractos pode produzir um efeito sinérgico quando adicionado ao chá verde (Jain *et al.*, 2011).

3.3.3.2 – Variação do perfil de compostos fenólicos em função do tempo de infusão

Dados os resultados anteriores que evidenciavam a influência do tempo de infusão sobre as propriedades e a composição do chá considerou-se interessante avaliar a forma como os diferentes fenólicos são extraídos a diferentes tempos e tentar perceber se as diferentes famílias de compostos fenólicos se dissolvem de acordo com cinéticas distintas. Para tal estudou-se o efeito do tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 min) na solubilização dos compostos fenólicos dum chá verde e dum chá preto, nomeadamente, no chá Encosta da Bruma e no chá Broken Leaf, ambos chás da Fábrica Gorreana, nos Açores.

3.3.3.2.1 – Chá Encosta da Bruma (Chá Verde)

- Análise a 280 nm

Os compostos identificados a este comprimento de onda no chá Encosta da Bruma, chá verde, bem como a gama de concentração de cada um dos compostos identificados ao longo do tempo de infusão, dos 0 aos 60 minutos, são listados na tabela 3.34.

Tabela 3. 34 - Compostos tentativamente identificados no chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 280 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Ácidos hidroxibenzoicos | | | |
| A1 | Ácido gálico | 16,21 – 16,44 | 0,54 – 8,24 | 239, 271 |
| A2 | Ácido 5-galoilquinico | 17,74 – 17,97 | 0,12 – 6,93 | 240, 274 |
| | Catequinas | | | |
| A4 | Galocatequina | 23,35 – 23,52 | 5,64 – 28,99 | 242, 270 |
| A5 | Epigalocatequina | 27,27 – 27,41 | 6,82 – 9,74 | 242, 273 |
| A6 | Isómero da galocatequina 1 | 36,27 – 36,68 | 8,86 – 35,47 | 242, 270 |
| A8 | Epicatequina | 46,84 – 47,30 | 12,45 – 85,03 | 242, 279 |
| A9 | EGCG + Ác. Cumárico | 47,59 – 48,07 | 8,17 – 158,41 | 271, 275; 242, 307 |
| A10 | Galocatequina-3-galato | 51,82 – 52,17 | 0,13 – 2,18 | 242, 274 |
| A11 | Composto Desconhecido 1 (Catequina) | 54,85 – 55,03 | 6,50 – 19,43 | 238, 273, 350 |
| A12 | Epicatequina-3-galato | 58,07 – 58,69 | 1,23 – 45,67 | 241, 277 |
| | Metilxantinas | | | |
| A3 | Teobromina | 22,58 – 22,73 | 0,38 – 3,50 | 241, 272 |
| A7 | Cafeína | 38,70 – 39,07 | 23,97 – 153,07 | 240, 272 |

A variação das concentrações de cada um dos compostos identificados é apresentada nas figuras 3.45 e 3.46.

Dos compostos maioritários extraídos a epigalocatequina-3-galato e a cafeína foram os compostos dominantes, o que foi verificado por vários autores (Komes *et al.*, 2010), seguindo-se a epicatequina. Da composição da folha da *Camellia sinensis* produzida nos Açores verifica-se que, no que respeita às catequinas, a epigalocatequina-3-galato é a mais abundante, seguida da epigalocatequina, da epicatequina-3-galato e da epicatequina, com teores de 47,9%, 13,2%, 7,7% e de 5,7%, respectivamente (Baptista *et al.*, 1999).

Noutro estudo (Piovan *et al.*, 2014), a cafeína e teobromina foram encontrados em todas as amostras, enquanto nunca foi detectado teofilina, provavelmente devido aos níveis muito baixos para permitir a sua detecção. O teor de cafeína encontrado foi superior ao da teobromina.

Estudos mostraram que havia diferenciação na migração/dissolução das moléculas de catequinas. Assim, as menores moléculas destes flavonóides, epicatequina e epigalocatequina são mais rapidamente extraídas que as maiores moléculas, epigalocatequina-3-galato e epicatequina-3-galato (Grazma *et al.*, 2005).

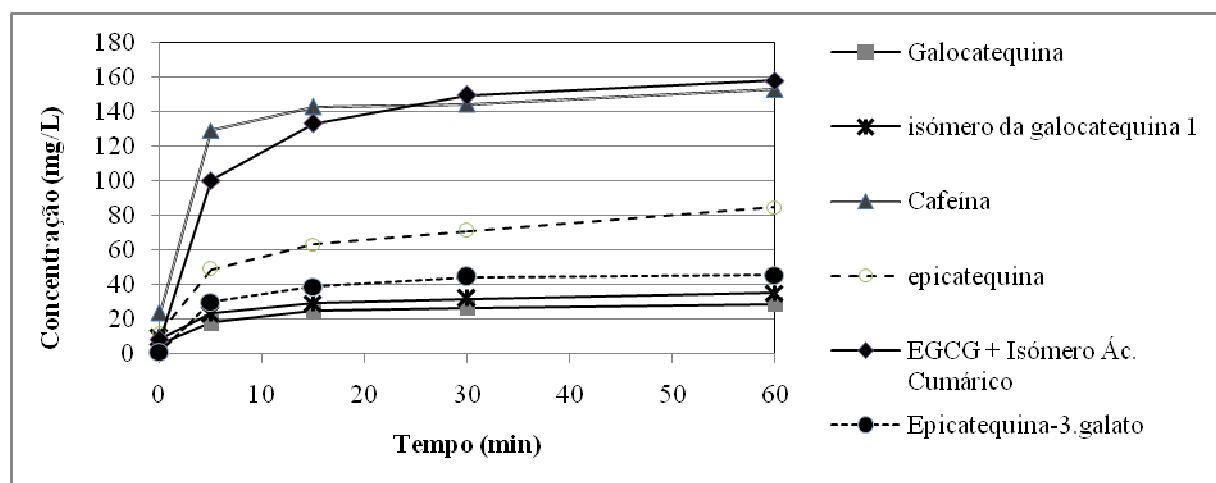


Figura 3. 45 – Evolução das concentrações das catequinas, metilxantina e ácidos hidroxibenzóicos maioritários no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão (concentração acima de 20 mg/L).

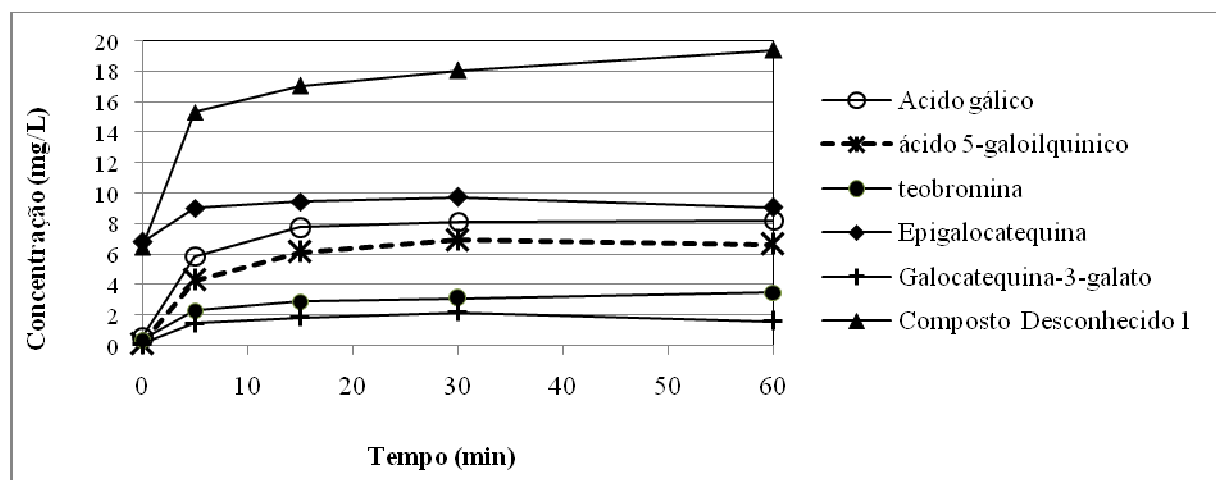


Figura 3. 46 – Evolução das concentrações das catequinas, metilxantina e ácidos hidroxibenzóicos minoritários no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão (concentração abaixo de 20 mg/L).

Em todos os compostos determinados a este comprimento de onda, verifica-se que a extracção é dependente do tempo, pois com o aumento do tempo aumenta o teor de cada um dos compostos na infusão, o que está de acordo com outros estudos (Labbé *et al.*, 2006).

Verifica-se que todas as catequinas, metilxantinas e ácidos benzóicos têm uma forte correlação com o tempo ($0,6 < |r| < 0,9$) com excepção da epigalocatequina e da galocatequina-3-galato cuja correlação é apenas moderada ($0,3 < |r| < 0,6$).

Entre os 0 e 5 min é o período no qual se verifica a mais elevada velocidade de dissolução dos compostos identificados com um maior incremento da concentração de cada um dos compostos na infusão. Após os 5 min e até aos 30 min, a velocidade decresce significativamente levando a um menor aumento da concentração dos compostos em solução. A partir dos 30 min até aos 60 min, a dissolução dos compostos ácido gálico, ácido 5-galoilquínico, teobromina, galocatequina, isómero da galocatequina, epigalocatequina-3-galato, cafeína e epicatequina-3-galato estabiliza mantendo-se a sua concentração essencialmente constante, enquanto as catequinas epigalocatequina e galocatequina-3-galato decrescem a sua concentração e o composto desconhecido 1 continua a aumentar a sua concentração mas a uma velocidade muito menor.

Os resultados obtidos correspondem a cinéticas de dissolução semelhantes para os vários compostos considerados sendo a velocidade inicial de dissolução dependente sobretudo da concentração e disponibilidade desse componente nas folhas do chá e sendo a força osmótica o principal motor da sua dissolução. O decréscimo das catequinas a partir dos 15 min pode dever-se a reacções secundárias que se tornam importantes à medida que a concentração destes componentes aumenta em solução.

Em relação à cafeína, um estudo (Suteerapataranon *et al.*, 2009) verificou que após os 15 minutos a velocidade de dissolução estabilizou, mantendo-se a concentração essencialmente constante, o que é coerente com o presente estudo.

A tendência observada na dissolução das catequinas e da cafeína a partir das folhas de chá verde em água fervida é mais provavelmente atribuível às constantes de equilíbrio dos complexos formados entre estes compostos fenólicos e os iões de metais de transição mais abundantes e disponíveis nas folhas de chá (El-Shahawi *et al.*, 2012).

Considerando o total dos componentes extraídos (tabela 3.35) verifica-se que as catequinas e as metilxantinas aumentam a sua concentração com o tempo de infusão. Igual observação foi efectuada noutros estudos. Komes e sua equipa (Komes *et al.*, 2010) verificaram que a concentração das catequinas aumentou ao longo do tempo de infusão de $911,12 \pm 23,61$ mg/L aos 3 min para os $1431,89 \pm 38,42$ mg/L para os 30 min de infusão. O mesmo foi verificado por Labbé e equipa (2006), sendo que a sua determinação de catequinas totais obteve valores de $1345,9$ µg/mL e de $2924,6$ µg/mL, para 5 e 80 minutos, respectivamente. Em relação às metilxantinas Komes e seus investigadores (2010) verificaram ainda que estas aumentaram a sua concentração na infusão dos 3 para os 30 minutos sendo os valores determinados de $318,76 \pm 25,14$ mg/L e de $345,15 \pm 29,03$ mg/L, respectivamente.

Os ácidos hidroxibenzóicos aumentaram a sua concentração até aos 30 minutos, o que também verificado por Komes e sua equipa (2010) cujos valores foram de $10,64 \pm 0,96$ mg/L para 3 min de infusão e de $12,47 \pm 1,15$ mg/L para os 30 min de infusão. Após esse tempo a concentração decresceu ligeiramente.

A diferença dos valores obtidos neste deve-se provavelmente à diferente forma de preparar as infusões.

Tabela 3. 35 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá verde Encosta da Bruma.

| Tempo de infusão (min) | Concentração (mg/L) | | |
|------------------------|---------------------|---------------|----------------------|
| | Catequinas | Metilxantinas | Ác. hidroxibenzóicos |
| 0 | 49,80 | 24,36 | 0,66 |
| 5 | 247,08 | 131,56 | 10,23 |
| 15 | 318,15 | 145,88 | 13,90 |
| 30 | 354,49 | 147,56 | 15,08 |
| 60 | 383,71 | 156,56 | 14,90 |

Estudos (Vidya & Julkarni, 2002) indicam que o chá verde inibe o crescimento de tumores cancerosos. Este proporciona protecção contra o desenvolvimento de leucemia após a exposição à radiação em ratinhos. As catequinas (flavan-3-ol) do chá provavelmente eliminam 90% da radiação que incide no corpo antes de atingir a medula óssea e provocar danos. As catequinas galato são as que apresentam um efeito radioprotector mais significativo. A epigallocatequina-3-galato (EGCG) altera as propriedades do receptor na superfície de células de rato e bloqueia a acção do promotor do tumor e, assim, evita a formação de células de tumor (Vidya & Julkarni, 2002).

Estudos indicam que a forma de preparação das infusões pode promover destruição dos compostos funcionais do chá ou a sua isomerização (Petisca et al., 2009; Horie et al., 1997) mas tal não se verificou nos ensaios de tempo de infusão crescente.

- Análise a 320 nm

Foi feita a monitorização e identificação dos componentres cuja absorvância era maior a 320 nm. Assim foram identificados os compostos expressos na tabela abaixo (tabela 3.36), bem com são referidas as gamas de concentração e o comprimento de onda onde a absorção é máxima.

Tabela 3. 36 - Compostos tentativamente identificados no chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 320 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|------|---|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Ácidos hidroxicinâmicos | | | |
| B1 | Ácido Hidroxicinâmico | 26,74 – 26,88 | 0,11 – 1,84 | 247, 308, 326 |
| B2 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | 33,08 – 33,39 | 0,07 – 1,07 | 242, 300 - 315 |
| B3 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | 35,04 – 35,37 | 0,30 – 4,36 | 241, 314 |
| B4 | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Clorogénico + Cafeína | 39,48 – 39,86 | 2,17 – 5,95 | 238, 274, 327 |
| B5 | Ácido Clorogénico | 40,97 – 41,39 | 2,42 – 12,51 | 242, 327 |
| B6 | Ácido Hidroxicinâmico - Derivado Ác. Cumárico | 43,00 – 43,43 | 0,09 – 1,72 | 241, 294, 308 |
| | Flavonas | | | |
| B8 | Flavona Glicosilada (Vitexina-2"-O-Ramnosídeo) | 48,55 – 49,11 | 2,00 – 4,39 | 237, 270, 329-345 |
| B9 | Flavona Glicosilada | 52,94 – 53,45 | 2,00 – 3,94 | 240, 272, 327-340 |
| B10 | Flavona Glicosilada | 53,35 – 53,80 | 2,14 – 4,04 | 242, 272, 329-340 |

Tabela 3.36 (Continuação)

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | λ máx. (nm) |
|------|--|---------------------------|----------------------|---------------------|
| | Flavonóis | | | |
| B15 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | 76,53 – 77,16 | 1,96 – 5,29 | 267, 314 |
| B16 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | 77,62 – 78,27 | 1,94 – 4,24 | 268, 314 |
| B17 | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | 78,50 – 79,18 | 1,92 – 4,81 | 266, 313 |

A variação das concentrações de cada um dos compostos identificados é mostrada nas duas figura seguintes. Os compostos foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de compostos, sendo o primeiro (figura 3.47) referente aos ácidos hidroxicinâmicos e o segundo figura (figura 3.48) referente aos restantes compostos identificados, flavonas glicosiladas e flavonóis glicosilados acilados.

Verifica-se que todos os compostos identificados (ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis glicosilados acilados), têm uma forte correlação com o tempo de infusão ($0,6 < |r| < 0,9$), aumentando a sua dissolução com o aumento do tempo.

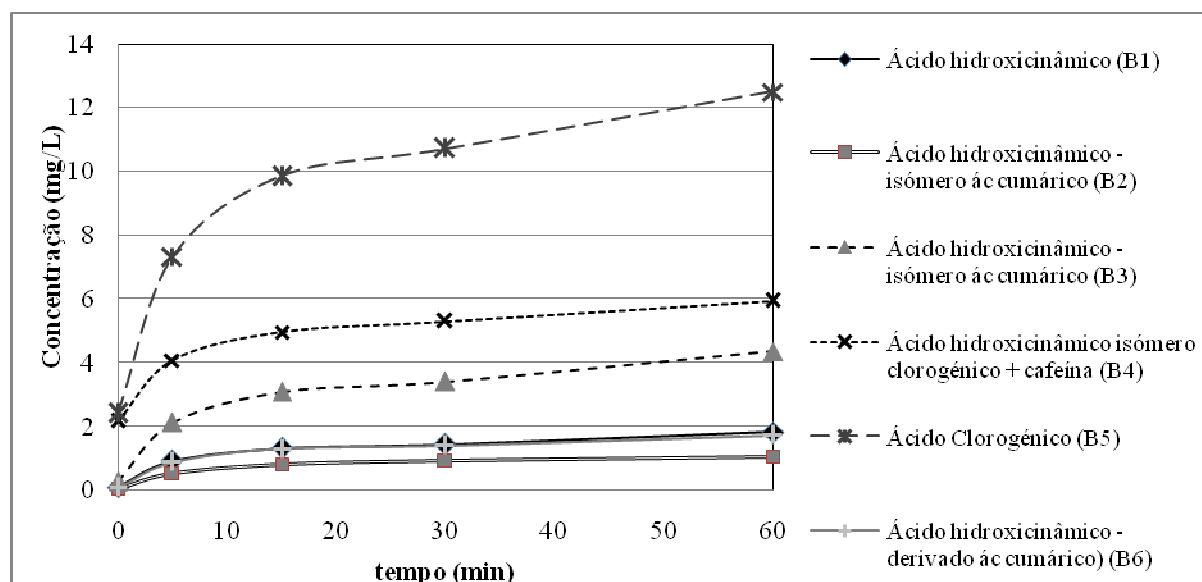


Figura 3. 47 – Evolução das concentrações dos ácidos hidroxicinâmicos no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

A partir dos 10 minutos de infusão os ácidos hidroxicinâmicos são extraídos na sua maioria. No entanto, todos eles continuam a aumentar, embora muito gradualmente, a sua concentração na infusão com o aumento de tempo. O ácido clorogénico (B5) é o que mantém o maior índice de dissolução.

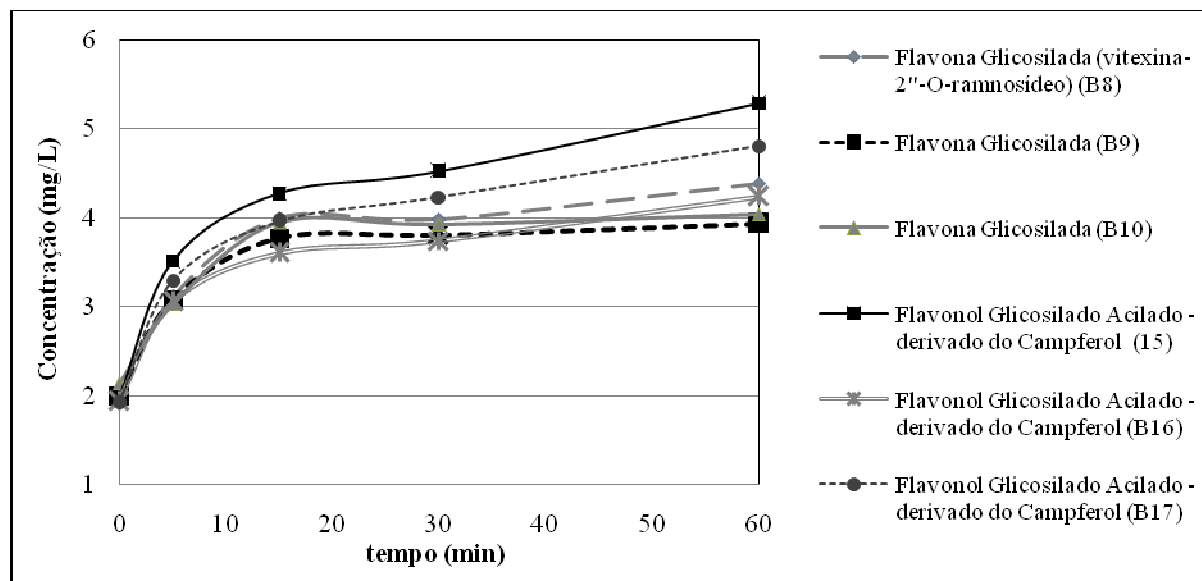


Figura 3. 48 – Evolução das concentrações das flavonas glicosiladas e flavonóis glicosilados acilados no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

No que diz respeito às flavonas glicosiladas e aos flavonóis glicosilados acilados existe uma rápida dissolução até aos 15 minutos e após esse tempo todos os compostos continuam a dissolver-se a uma velocidade menor. Os compostos flavona glicosilada (B9) e flavonol glicosilado acilado (B17) destacam-se dos outros componentes uma vez que a velocidade de dissolução apesar de ser inferior à inicial é superior à dos outros compostos identificados.

Considerando o total dos componentes extraídos (tabela 3.37) verifica-se que a concentração dos ácidos hidroxycinâmicos e flavonóis glicosilados acilados na infusão aumenta sempre ao longo do tempo (dos 0 aos 60 minutos), embora até aos 15 minutos a velocidade de dissolução seja maior que no restante tempo. Quanto às flavonas glicosiladas a sua concentração em solução aumenta até aos 15 minutos e após esse tempo a velocidade estabiliza até aos 30 minutos, voltando a crescer até aos 60 minutos.

Tabela 3. 37 - Variação da concentração média de ácidos hidroxycinâmicos, flavonas glicosiladas e com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá verde Encosta da Bruma

| Tempo de infusão (min) | Concentração (mg/L) | | |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| | ácidos hidroxycinâmicos | flavonas glicosiladas | flavonóis glicosilados acilados |
| 0 | 5,14 | 6,13 | 5,82 |
| 5 | 15,92 | 9,23 | 9,86 |
| 15 | 21,37 | 11,72 | 11,84 |
| 30 | 23,25 | 11,72 | 12,50 |
| 60 | 27,44 | 12,37 | 14,34 |

Apesar das suas baixas concentrações a elevada actividade funcional de ácidos hidroxycinâmicos, flavonóis e flavonas justificou a sua inclusão nesta análise.

Estudos *in vitro*, *in vivo* e epidemiológicos mostraram que os ácidos hidroxycinâmicos, nomeadamente, os ácidos clorogénicos apresentam propriedades benéficas para a saúde, entre as quais apresentam funções como antioxidantes, hepatoprotectoras, antiviral e hipoglicémicas (Marques & Farah, 2009). Outros estudos verificaram que as flavonas e os seus glucosídeos agem nas plantas, nomeadamente na

Camellia sinensis, como agentes de protecção das radiações UV, microorganismos e pragas. Agem ainda como antioxidantes, anticarcinogénico e antimutagénico (Engelhardt *et al.*, 1993).

- Análise a 360 nm

Para os 360 nm foi feita a identificação de flavonóis glicosilados com algum significado a nível do cromatograma e a determinação da concentração (mg/L) para cada um dos tempos de infusão. A listagem dos compostos identificados está colocada na tabela 3.38.

Tabela 3. 38 - Compostos tentativamente identificados no chá verde Encosta da Bruma (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 360 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|------|--|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| | Flavonóis | | | |
| C1 | Flavonol Glicosilado + Catequina | 54,77 – 55,36 | 1,92 – 3,75 | 239, 272, 358 |
| C2 | Flavonol Glicosilado | 55,28 – 55,84 | 1,99 – 5,39 | 238, 254, 358 |
| C8 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 56,36 – 56,98 | 1,97 – 5,65 | 238, 261, 346 |
| C3 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 57,17 – 57,79 | 2,31 – 9,22 | 237, 256, 358 |
| C9 | Flavona Glicosilada | 58,93 – 59,65 | 2,10 – 5,50 | 253, 345 |
| C4 | Quercetina Glicosilada | 59,31 – 60,00 | 3,36 - 23,63 | 237, 256, 354 |
| C10 | Quercetina Glicosilada | 60,37 – 61,10 | 2,02 – 5,28 | 235, 257, 357 |
| C11 | Quercetina Glicosilada | 61,11 – 61,87 | 2,25 – 7,46 | 238, 256, 355 |
| C5 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 61,52 – 62,29 | 2,21 – 8,10 | 238, 265, 346 |
| C12 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 62,31 – 63,07 | 1,90 – 3,69 | 237, 266, 350 |
| C6 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 64,23 – 65,02 | 2,78 – 15,74 | 238, 265, 349 |
| C7 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 66,18 – 66,98 | 2,14 – 6,28 | 237, 265, 346-354 |

A variação das concentrações de cada um dos compostos identificados é mostrada nas duas figuras seguintes. Os compostos foram divididos em dois grupos de acordo com a extensão de dissolução, sendo o primeiro (figura 3.49) referente aos compostos cuja sua concentração variou até valores superiores a 6 mg/L e o segundo figura (figura 3.50) referente aos compostos cuja sua concentração não excedeu os 6 mg/L.

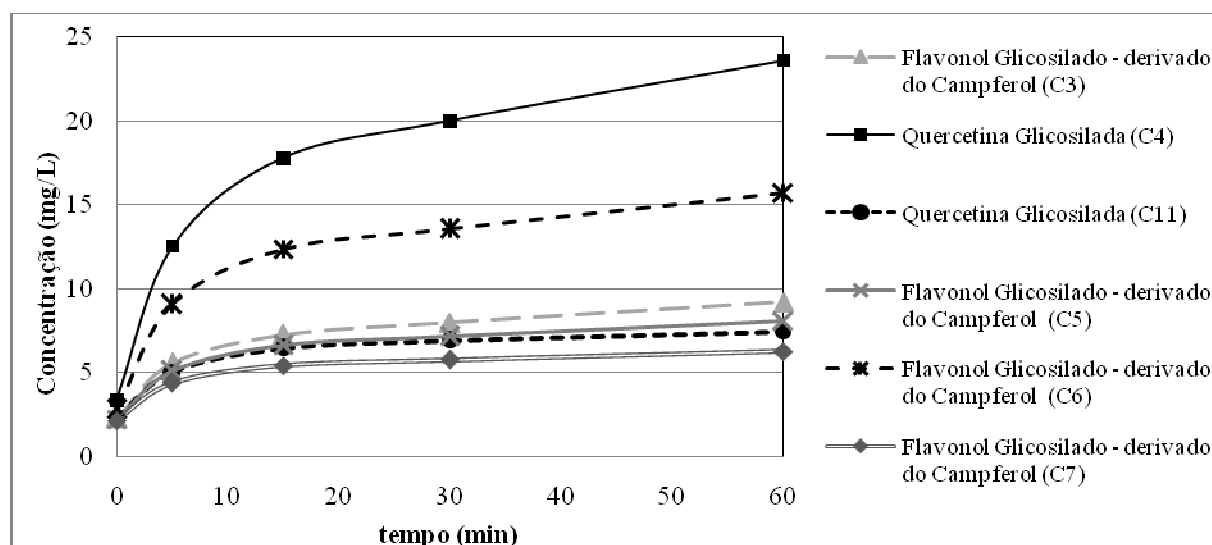


Figura 3. 49 – Evolução das concentrações dos compostos identificados a 360 nm cuja concentração fica acima de 6,0 mg/L no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

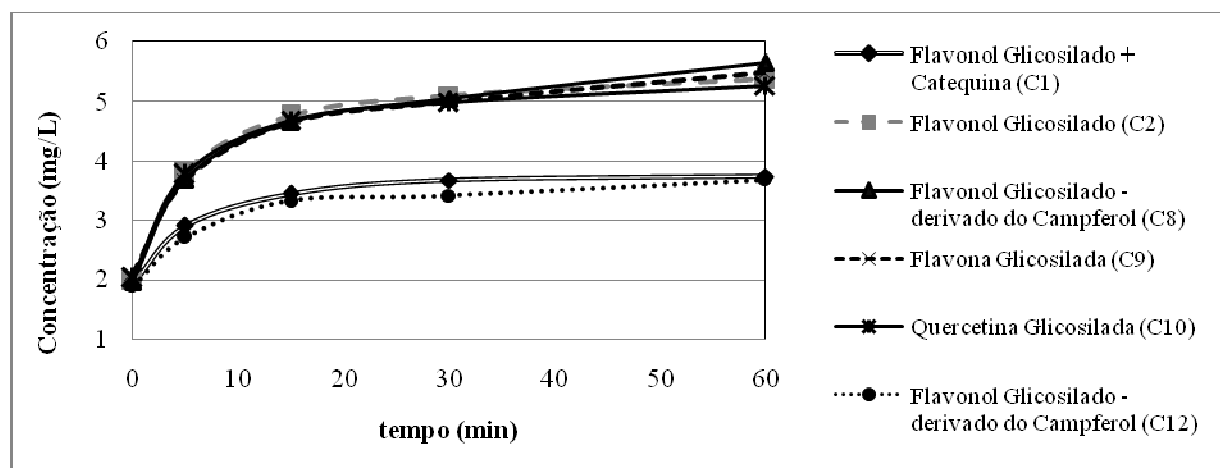


Figura 3. 50 – Evolução das concentrações dos compostos identificados a 360 nm cuja concentração fica abaixo de 6,0 mg/L no chá verde Encosta da Bruma, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

Como nos compostos anteriormente identificados a dissolução destes compostos faz-se com maior intensidade até aos 15 minutos sendo que a partir daí a velocidade decresce, ou mesmo estabiliza.

Verifica-se que todos os compostos identificados (flavona glicosiladas e flavonóis glicosilados), têm uma forte correlação com o tempo de infusão ($0,6 < |r| < 0,9$), aumentando a sua dissolução com o aumento do tempo.

A cor é uma das qualidades sensoriais determinantes para o chá verde. Entre os flavonóides (catequinas e flavonóis) detectados em infusões de chá verde, a quercetina foi demonstrado que é o composto fenólico mais importante que contribui para a cor da infusão de chá (Wang *et al.*, 2004).

Considerando todos os grupos de compostos identificados no chá Encosta da Bruma verifica-se que, apesar dos teores de cada um dos grupos de compostos aumentar ao longo do tempo (dos 5 aos 60 minutos) (tabela 3.39), as percentagens relativas destes grupos têm comportamentos diferentes. Enquanto as catequinas aumentam a percentagem de 50,82% para 54,12% e os flavonoides glicosilados aumentam de 12,06% para 13,28%, as metilxantinas baixam de 27,06% para 22,08%. Os ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos as flavonas glicosiladas e os flavonóis glicosilados acilados mantêm a sua percentagem relativa aproximadamente constante.

Tabela 3. 39 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas, flavonóis glicosilados acilados e de flavonóis glicosilados com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá verde Encosta da Bruma

| Tempo de infusão (min) | Concentração (mg/L) | | | | | | | |
|------------------------|---------------------|----------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|----------------------|------------------|
| | Catequinas | Metil-xantinas | Ácidos hidroxibenzoicos | Ácido hidroxicinâmico | Flavona Glicosilada | Flavonol Glicosilado Acilado | Flavonol Glicosilado | Total polifenóis |
| 0 | 49,80 | 24,36 | 0,66 | 5,14 | 8,24 | 5,82 | 24,87 | 118,89 |
| 5 | 247,08 | 131,56 | 10,23 | 15,92 | 12,91 | 9,86 | 58,63 | 486,19 |
| 15 | 318,15 | 145,88 | 13,90 | 21,37 | 16,37 | 11,84 | 76,84 | 604,34 |
| 30 | 354,49 | 147,56 | 15,08 | 23,25 | 16,73 | 12,50 | 83,67 | 653,30 |
| 60 | 383,71 | 156,56 | 14,90 | 27,44 | 17,87 | 14,34 | 94,19 | 709,02 |

Um estudo (Price *et al.*, 1998) determinou o teor de flavonóis glicosilados totais para seis chás regionais e verificou que estes apresentavam valores entre 36,5 mg/L e 75,8 mg/L, quando a preparação da infusão foi de 3,0 g de chá em 200 mL água fervente durante 4 minutos. Este estudo apresenta valores de flavonóis glicosilados totais coerentes com presente trabalho, apesar da diferente forma de preparação da infusão.

As catequinas são compostos incolores e solúveis em água, sendo responsáveis pelo amador e adstringência das infusões de chá verde (Del-Rio *et al.*, 2004; Komes *et al.*, 2010). A infusão com água a temperatura elevada, neste estudo, água fervente, extrai um maior conteúdo flavonóis o que confere à infusão uma adstringência excessiva (Komes *et al.*, 2010). Estes estudos foram confirmados por outro (Buratti *et al.*, 2013) que utilizou língua e nariz electrónicos os quais definiram as características do chá verde. Estes após maior tempo de infusão, 10 minutos ao invés de 3-5 minutos, os chás verdes foram caracterizados por um sabor adstringente e uma boca-final adstringente. Quanto ao aroma, o aumento de tempo de infusão conferiu-lhe um excelente aroma (Buratti *et al.*, 2013).

Adicionalmente, uma extracção prolongada favorece a isomerização das maiores catequinas (Komes *et al.*, 2010; Perva-Uzunalic *et al.*, 2006). Num estudo (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006) o teor das maiores catequinas foi máximo após 20 minutos de infusão a 80°C e após 10 minutos a 95°C, cerca de 550 e de 490 g catequinas/kg de extracto seco, respectivamente; com o aumento do tempo de extracção até às 2 horas, os teores descenderam para 400 e para 220 g catequinas/kg de extracto seco, respectivamente. Neste mesmo estudo é mostrado o mesmo tipo de destruição para com os flavonóis de miricetina, campferol e quercetina (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006).

3.3.3.3.2 – Chá Broken Leaf (Chá Preto)

- Análise a 280 nm

Os compostos identificados a 280 nm no chá Broken Leaf, chá preto, bem como a gama de concentração de cada um dos compostos identificados ao longo do tempo de infusão, dos 0 aos 60 minutos, estão listados na tabela 3.40.

Tabela 3. 40 - Compostos tentativamente identificados no chá preto Broken Leaf (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 280 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | λ máx. |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|
| Ácidos hidroxibenzoicos | | | | |
| D1 | Ácido hidroxibenzoico | 7,91 – 8,45 | 0,17 – 1,88 | 241, 263 |
| D2 | Ácido gálico | 15,54 – 16,52 | 0,92 – 14,29 | 238, 271 |
| D3 | Ácido 5-galoilquinico | 16,95 – 18,07 | 0,24 – 3,53 | 241, 274 |
| Catequinas | | | | |
| D7 | Composto fenólico desconhecido | 43,00 – 42,48 | 7,79 – 36,67 | 237, 290 |
| D8 | Epicatequina | 47,03 – 47,68 | 7,02 – 12,66 | 241, 279 |
| D9 | EGCG + Ác. Cumárico | 48,68 – 49,03 | 0,23 – 4,54 | 241, 271; 242, 307 |
| D10 | Epicatequina-3-galato | 58,16 – 58,61 | 0,95 – 8,52 | 242, 277 |
| Metilxantinas | | | | |
| D4 | Teobromina | 21,29 – 22,86 | 0,36 – 2,94 | 241, 272 |
| D5 | Teofilina | 24,86 – 27,72 | 0,35 – 3,05 | 241, 273 |
| D6 | Cafeína | 35,05 – 39,37 | 22,01 – 168,20 | 241, 272 |

*compostos identificados por comparação com padrões

O conteúdo das catequinas do chá, ácido gálico e cafeína está relacionado com a qualidade das folhas de chá e do grau de fermentação durante a fabricação do chá preto (Zuo *et al.*, 2002).

A variação das concentrações de cada um dos compostos identificados é mostrada nas duas figuras seguintes. Aí os compostos foram divididos em dois grupos de acordo com a extensão de dissolução, sendo o primeiro (figura 3.51) referente aos compostos cuja sua concentração variou até valores superiores a 14 mg/L e o segundo figura (figura 3.52) referente aos compostos cuja sua concentração não excedeu os 14 mg/L.

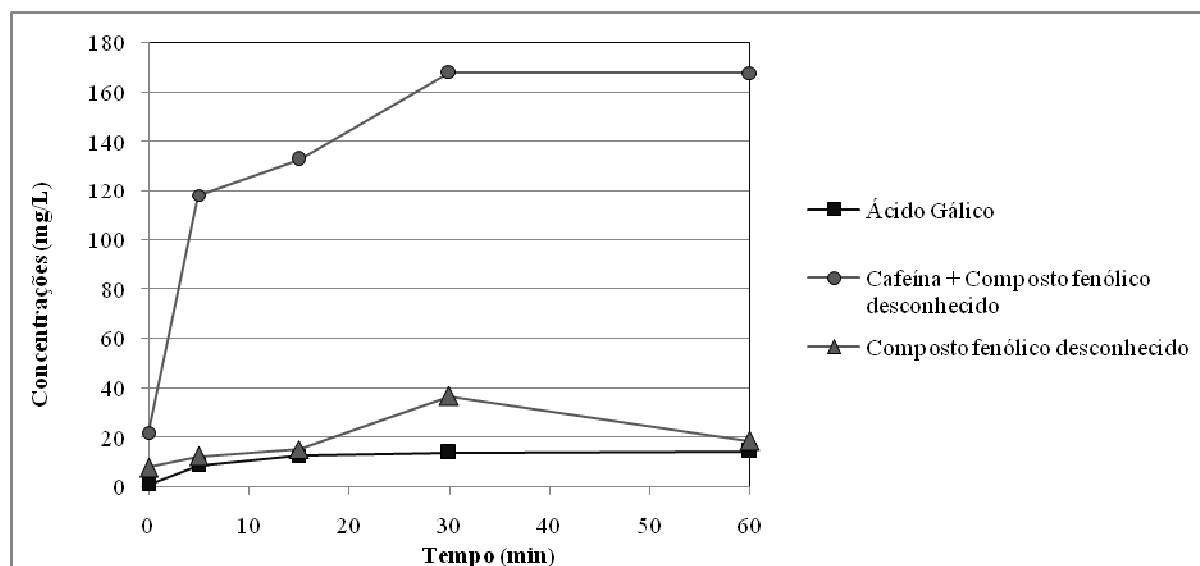


Figura 3. 51 – Evolução das concentrações das catequinas e ácidos hidroxibenzoicos maioritários no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

O composto maioritário neste estudo foi a cafeína, o qual foi seguido por um composto desconhecido e pelo ácido gálico.

O teor de cafeína extraído no chá preto aumentou na infusão até aos 30 minutos e após esse tempo estabilizou. Este teor, no chá preto, é comparável com o que foi extraído no chá verde.

A cafeína estimula o sistema nervoso central e, consequentemente, melhora o estado de alerta e o tempo de reacção enquanto reduz o cansaço, no entanto doses mais elevadas de cafeína (mais de 200 mg/dia) podem causar problemas de saúde, nomeadamente, dores de cabeça, nervosismo, tremores e outros (Ramalho *et al.*, 2013).

Quanto ao ácido gálico aumentou a sua concentração com o aumento do tempo de infusão até aos 15 minutos, após esse tempo o seu aumento em solução é muito pequeno. O composto desconhecido aumenta o seu teor na infusão até aos 30 minutos e a seguir a sua concentração decresce.

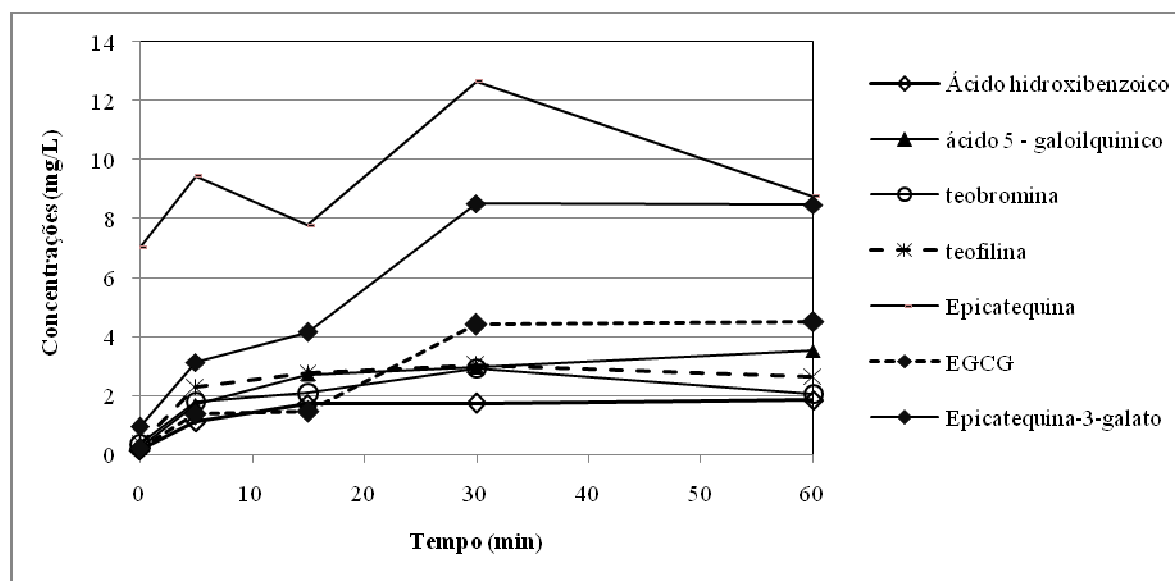


Figura 3. 52 – Evolução das concentrações das catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos minoritários no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

Durante o tempo de infusão considerado, no chá preto, observam-se aumentos de concentração dos compostos seguidos de estabilização ou mesmo decréscimo após o que se observa novo aumento.

Assim temos que o ácido 5-galoilquinico e o ácido benzoico aumentam a sua concentração durante o tempo de infusão sendo a sua velocidade de extracção maior dos 0 aos 5 minutos. A teofilina, aumenta a sua concentração até aos 5 minutos e apartir daí estabiliza ou diminui ligeiramente. A teobromina aumenta a sua concentração até aos 30 minutos e após decresce até aos 60 minutos. As catequinas galato (epicatequina-3-galato e epigalocatequina-3-galato) aumentam a concentração até aos 30 minutos e depois estabilizam. O mesmo não acontece com a epicatequina que aumenta a sua concentração dos 0 aos 5 minutos e dos 15 aos 30 minutos e decresce nos períodos de tempo dos 5 aos 15 minutos e dos 30 aos 60 minutos.

Comparando o teor das catequinas do chá preto com o chá verde, verifica-se que no chá preto este é bastante inferior. Este facto resulta da oxidação e polimerização das catequinas durante o processo de fermentação (Vermeer *et al.*, 2008).

Verifica-se que todas as catequinas, metilxantinas e ácidos benzóicos têm uma forte correlação com o tempo ($0,6 < |r| < 0,9$) com excepção da teobromina (D4), da teofilina (D5), do composto fenólico desconhecido (D7) e epicatequina (D8) cuja correlação é apenas moderada ($0,3 < |r| < 0,6$).

Considerando o total dos componentes extraídos (tabela 3.41) verifica-se que, independentemente do comportamento dos compostos individuais, as catequinas e as metilxantinas aumentam a sua concentração com o tempo de infusão até aos 30 minutos e dos 30 aos 60 minutos as suas concentrações baixam. Os ácidos benzoicos aumentam sempre a sua concentração entre os 0 e os 60 minutos.

Tabela 3. 41 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzoicos com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá preto Broken Leaf

| Tempo de infusão (min) | Concentração (mg/L) | | |
|------------------------|---------------------|---------------|------------------|
| | Catequinas | metilxantinas | ácidos benzóicos |
| 0 | 16,00 | 22,72 | 1,33 |
| 5 | 26,29 | 122,25 | 11,57 |
| 15 | 28,65 | 137,70 | 16,92 |
| 30 | 62,28 | 174,19 | 18,64 |
| 60 | 40,27 | 172,47 | 19,70 |

Este comportamento de aumento e diminuição dos compostos na infusão pode ser explicado com base na temperatura. À temperatura inicial (100°C), que é a mais elevada, há uma melhor solubilização dos compostos (Yang *et al.*, 2007). No entanto, como a temperatura começa a diminuir ao longo do tempo, a solubilização tende a diminuir a partir de determinada temperatura (Ramalho *et al.*, 2013).

A formação de componentes de grande peso molecular dá-se apenas no chá preto durante a fermentação e portanto é nesse chá que é mais provável que ocorra a hidrólise dos polifenóis durante a infusão. Estudos mostraram (Yang *et al.*, 2007; Suteerapataranon *et al.*, 2009) que na segunda infusão de um dado chá (saco de chá) se verifica um aumento de cafeína, catequinas e ácido gálico extraídos, o que parece indicar que a libertação destes componentes pode estar condicionada por uma boa hidratação da folha e eventualmente da hidrólise das ligações existentes entre os componentes e a matriz vegetal.

- Análise a 320 nm

Os compostos identificados a 320 nm no chá Broken Leaf, chá preto, bem como a gama de concentração de cada um dos compostos identificados ao longo do tempo de infusão, dos 0 aos 60 minutos, estão listados na tabela 3.42.

Tabela 3. 42 - Compostos tentativamente identificados no chá preto Broken Leaf (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 320 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | λ máx. |
|--------------------------------|---|---------------------------|----------------------|----------------|
| Ácidos hidroxycinâmicos | | | | |
| E2 | Ácido Hidroxycinâmico - Isómero do Ác Cumárico | 28,66 – 33,47 | 0,00 – 0,30 | 237, 314 |
| E3 | Ácido Hidroxycinâmico - Isómero do Ác Cumárico | 30,87 – 35,80 | 0,09 – 1,70 | 311 |
| E4 | Ácido Hidroxycinâmico - Isómero do Ác Clorogénico | 37,21 – 41,78 | 1,81 – 3,20 | 246, 325 |
| E5 | Ácido Cumárico* | 43,59 – 48,16 | 0,43 – 6,63 | 242, 309 |
| E8 | Ácido Hidroxycinâmico - Isómero do Ác Cumárico | 48,12 – 53,33 | 0,08 – 0,73 | 241, 310 |
| Flavonas | | | | |
| E6 | Flavona Glicosilada | 44,90 – 49,32 | 2,00 – 4,43 | 237, 272, 338 |
| E9 | Flavona Glicosilada | 49,05 – 53,89 | 2,16 – 4,29 | 237, 272, 338 |
| E10 | Flavona Glicosilada | 49,29 – 54,17 | 2,05 – 5,70 | 237, 272, 340 |
| Flavonóis | | | | |
| E13 | Flavonol Acilado Glicosilado | 69,81 – 77,73 | 1,98 – 4,92 | 266, 318 |
| E14 | Flavonol Acilado Glicosilado | 70,71 – 78,89 | 1,98 – 3,65 | 264, 318-320 |
| E15 | Flavonol Acilado Glicosilado | 71,33 – 79,80 | 1,96 – 4,92 | 267, 314-321 |
| E16 | Flavonol Acilado Glicosilado | 71,43 – 80,55 | 1,88 – 3,18 | 268, 317-320 |

*compostos identificados por comparação com padrões

A variação das concentrações de cada um dos compostos identificados é mostrada nas três figuras seguintes. Os compostos foram divididos em três grupos de acordo com o tipo de compostos, sendo o primeiro (figura 3.53) referente aos ácidos hidroxycinâmicos e o segundo (figura 3.54) referente às flavonas glicosiladas e o terceiro (figura 3.55) referente aos flavonóis glicosilados acilados.

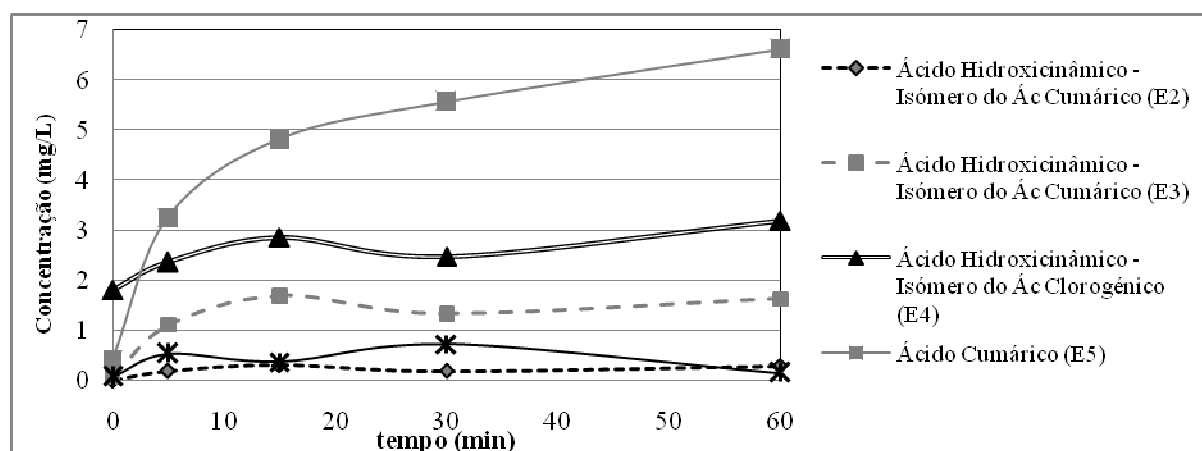


Figura 3. 53 – Evolução das concentrações dos ácidos hidroxycinâmicos no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

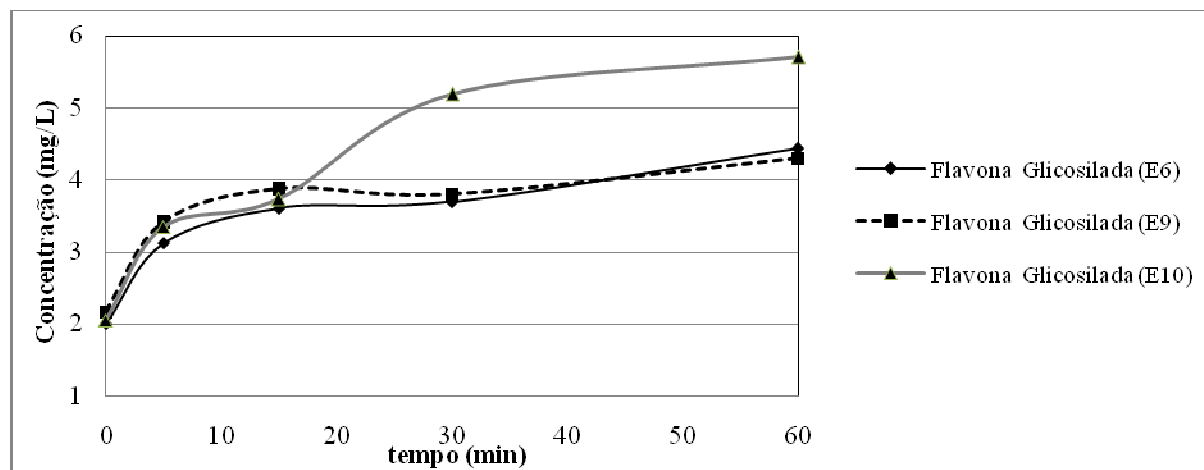


Figura 3. 54 – Evolução das concentrações das flavonas no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

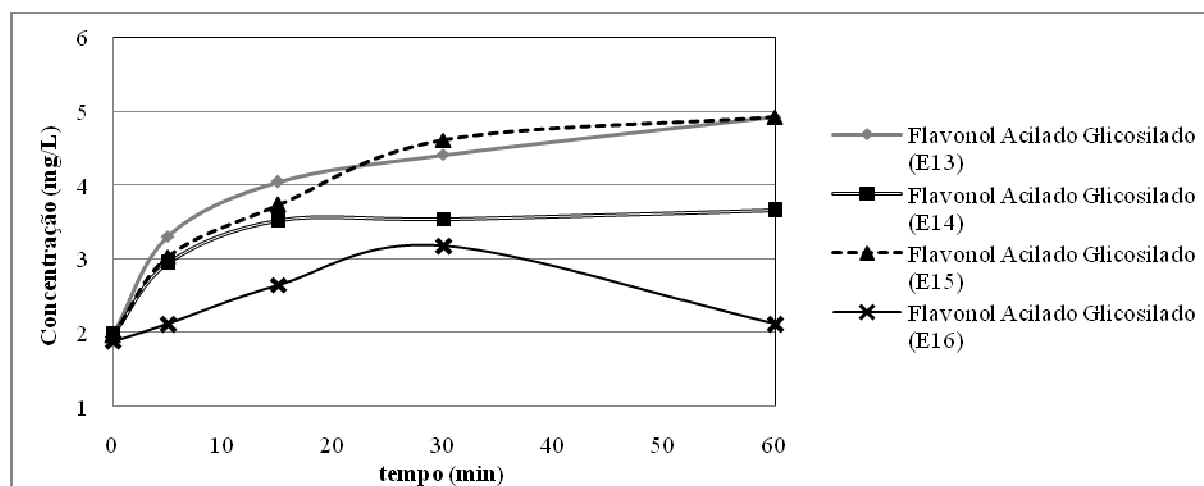


Figura 3. 55 Evolução das concentrações dos flavonóis acilados glicosilados no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão.

Verifica-se que todos os ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis acilados glicosilados têm uma forte correlação com o tempo ($0,6 < |r| < 0,9$) com exceção da flavona glicosilada (E10) que tem uma correlação muito forte ($|r| > 0,9$) e o ácido hidroxicinâmico, derivado do ácido cumárico (E8) e flavonol acilado glicosilado (E16) cuja correlação é apenas fraca ($|r| < 0,3$).

Durante o tempo de infusão considerado, à semelhança dos compostos identificados a 280 nm, observam-se aumentos de concentração dos compostos seguidos de estabilização ou mesmo decréscimo após o que se observa novo aumento. Este comportamento é verificado por outros autores. Ramalho e sua equipa (2013) estudou nos chás pretos analisados com origens diferentes (Brasil, Índia e Inglaterra) o teor dos ácidos clorogénico e cumárico ao longo do tempo (dos 0 aos 30 minutos). Verificou que o ácido clorogénico aumenta o seu teor nos períodos dos 0 aos 5 min, dos 7,5 aos 10 min e dos 20 aos 30 min, decrescendo dos 5 aos 7,5 min e dos 10 aos 20 minutos, para o chá da Índia, e aumenta dos 0 aos 15 min e diminui dos 15 aos 30 min para o chá inglês. Em relação ao ácido cumárico, o seu teor aumenta dos 0 aos 5 min e dos 20 aos 30 min e decresce entre os 5 aos 20 min para o chá da Índia, aumenta dos 7,5 aos 15 min e decresce dos 0 aos 7,5 min e dos 15 aos 30 min para o chá inglês e aumenta sempre dos 0 aos 30 minutos para o chá do Brasil (Ramalho *et al.*, 2013).

Outro estudo (Lachman *et al.*, 2003) verificou estas mesmas variações no chá preto as quais foram expressas em fenólicos totais. Assim, foram estudados seis chás pretos, para os quais se verificou que na primeira fase de infusão, a extracção foi elevada (17,33 a 63,13 g/kg de chá para 1min, 31,28 a 83,65 g/kg de chá para 5 min), depois a velocidade baixa para tempos de infusão mais longos (34,43 a 85,68 g/kg de chá para os 10 min, 51,85 a 87,37 g/kg de chá para 20 min, 34,99 a 105,20 g/kg de chá para 30 min e de 44,56 a 101,28 g/kg de chá para 60 min. Os máximos de teores dos fenólicos totais apresentados pelos chás pretos são: para o chá Assam CTC de 87,83 e de 99,74 g/kg de chá, para os 8 e os 60 minutos, respectivamente; para o Ceylon “Adam’s Peak” de 79,27, 91,10 e 91,17 g/kg de chá, para os 15, 30 e 60 min, respectivamente; para o Ceylon “Tiger River” de 53,66, 67,58 e 74,71 g/kg de chá, para os 5, 15 e 60 min, respectivamente; para o Darjeeling de 68,80 e 105,20 g/kg de chá, para os 5 e 30 min, respectivamente; para o Yunnan Hong de 64,50 e 75,22 g/kg de chá, para os 10 e os 45 min, respectivamente; e para o Pur’Er de 51,85 e de 44,56 g/kg de chá, para os 20 e 60 min, respectivamente (Lachman *et al.*, 2003).

O processo de fermentação para obtenção do chá preto provoca a polimerização e a oxidação das catequinas dando origem a teoflavinas e teorrubiginas. Pode ainda promover o estabelecimento de ligações químicas com componentes da matriz que posteriormente tornam a libertação desses componentes no chá preto menos fácil que no chá verde (Sang *et al.*, 2011). Talvez por esta razão tradicionalmente, na China, o chá preto seja preparado a uma temperatura mais alta (100°C) que o chá verde (70-80°C) (Yang *et al.*, 2007).

O processo de fermentação, e mesmo o de infusão com água acima dos 80°C, provoca a degradação e a epimerização (a conversão das catequinas do chá nos isómeros correspondentes). Um estudo (Wang & Helliwell, 2000a) indica que misturando soluções padrões de catequinas com uma concentração 20 mM a água a 100°C, durante 20 min, estas sofrem conversão nos seus isómeros entre 19,0 % a 42,4% e degradação, com formação de outros compostos, entre 8,8% e 58 %. Verifica-se que, durante o tempo de infusão, a maior conversão verificada é a alteração da estrutura epi- para a estrutura não-epi-.

Considerando o total dos componentes extraídos e identificados a 320 nm (tabela 3.43) verifica-se que a maior velocidade de solubilização dos ácidos hidroxycinâmicos e flavonóis glicosilados acilados se verifica até aos 5 minutos, depois a velocidade vai decrescendo no entanto o total da concentração de cada um dos grupos de componentes aumenta ao longo do tempo (dos 0 aos 60 minutos).

Tabela 3. 43 - Variação da concentração média de ácidos hidroxycinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis glicosilados acilados com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá preto Broken Leaf.

| Tempo de infusão (min) | Concentração (mg/L) | | |
|------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|
| | Ácidos Hidroxycinâmicos | Flavonas Glicosiladas | Flavonol Glicosilado Acilado |
| 0 | 2,41 | 6,21 | 7,80 |
| 5 | 7,48 | 9,89 | 11,40 |
| 15 | 10,07 | 11,21 | 13,94 |
| 30 | 10,33 | 12,68 | 15,74 |
| 60 | 11,93 | 14,43 | 15,61 |

Comparando estes teores com os teores dos chás verdes verifica-se que, ao fim dos 60 minutos de infusão, os ácidos hidroxycinâmicos têm teores inferiores nos chás pretos em relação aos chá verdes, sendo de 11,93 e de 27,44 mg/L, respectivamente; as flavonas glicosiladas apresentam teores inferiores, de 14,43 e de 17,87 mg/L, respectivamente; e os flavonóis glicosilados acilados apresentam teores superiores, de 15,61 e de 14,34 mg/L, respectivamente.

- Análise a 360 nm

Para os 360 nm foi feita a identificação de flavonóis glicosilados com algum significado a nível do cromatograma e a determinação da concentração (mg/L) para cada um dos tempos de infusão. A listagem dos compostos identificados está colocada na tabela 3.44.

Tabela 3. 44 - Compostos tentativamente identificados no chá preto Broken Leaf (Gorreana) com vários tempos de infusão, ao comprimento de onda de 360 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | λ máx. |
|------------------|---|---------------------------|----------------------|------------------------------------|
| | Flavonóis | | | |
| F2 | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | 56,53 – 56,81 | 1,97 – 4,19 | 237, 265, 347 |
| F3 | Quercetina Glicosilada | 57,35 – 57,60 | 2,20 – 7,59 | 235, 256, 357 |
| F4 | Campferol glicosilado | 59,09 – 59,25 | 2,13 – 4,31 | 257, 347 |
| F5 | Isoquercitrina* | 59,52 – 59,77 | 1,98 – 23,70 | 237, 256, 355 |
| F6 | flavonol glicosilado - miricetina glicosilada | 60,60 – 60,88 | 1,98 – 3,76 | 236, 266, 356 |
| F7+ F8+ F9 | flavonóis glicosilados - miricetina glicosilada + 2 derivado do Campferol | 61,34 – 62,80 | 6,21 – 13,83 | 262, 356; 266, 345; 266, 349 |
| F10 | Campferol glicosilado | 64,51– 64,73 | 2,64 – 11,83 | 265, 346 |
| F11 | Campferol glicosilado | 66,45 – 66,71 | 2,04 – 4,25 | 238, 265, 350 |

*compostos identificados por comparação com padrões

Os flavonóides glicosilados são um dos grupos de polifenóis mais importantes do chá devido a sua actividade fisiológica, em especial o chamado efeito da vitamina P (regulação da permeabilidade capilar) e efeito hipertensivo (Miean & Mohamed, 2001). Estudos epidemiológicos existem indicando existir uma relação entre uma dieta rica em flavonóides e a redução de doenças de coração (Asif & Khodadadi, 2013).

A variação das concentrações de cada um dos compostos identificados no chá Broken Leaf é mostrada nas duas figuras seguintes. Os compostos foram divididos em dois grupos de acordo com a extensão de dissolução, sendo o primeiro (figura 3.56) referente aos compostos cuja sua concentração variou até valores superiores a 5 mg/L e o segundo figura (figura 3.57) referente aos compostos cuja sua concentração não excedeu os 5 mg/L.

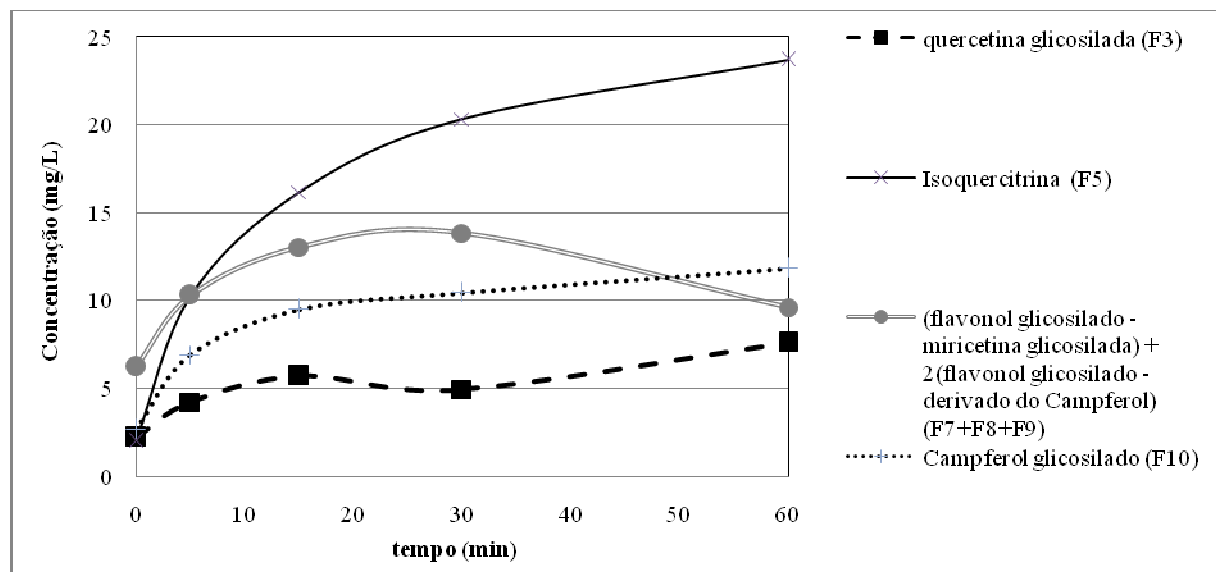


Figura 3. 56 – Evolução das concentrações dos flavonóis glicosilados no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão e cuja concentração em solução ultrapassa os 5 mg/L.

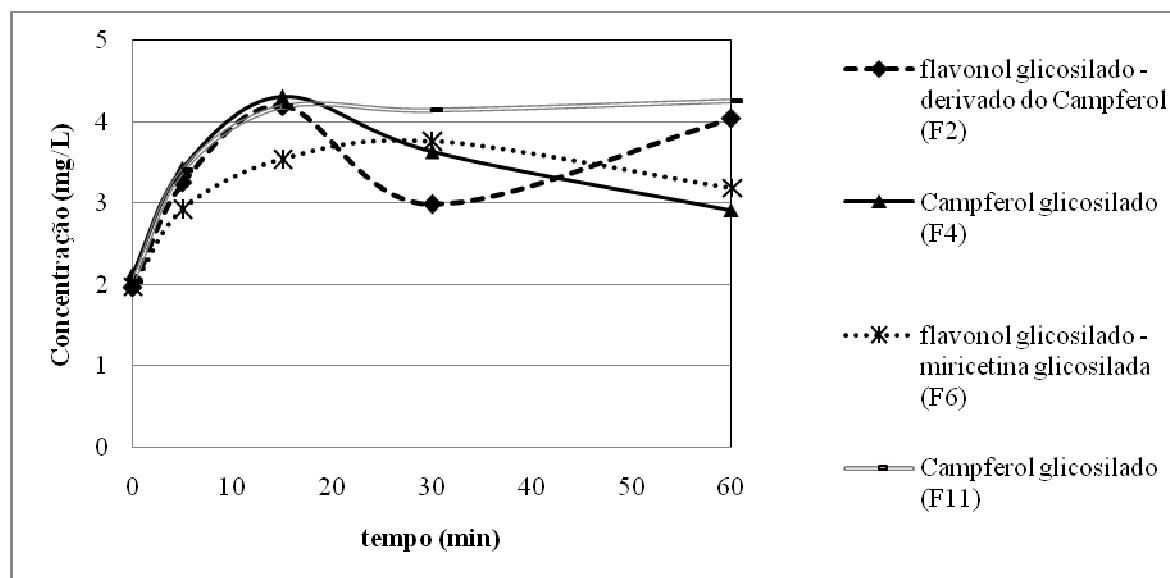


Figura 3. 57 – Evolução das concentrações dos flavonóis glicosilados no chá preto Broken Leaf, dos 0 aos 60 minutos de infusão e cuja concentração em solução não ultrapassa os 5 mg/L.

À semelhança dos compostos identificados no chá preto, durante o tempo de infusão considerado, observam-se aumentos de concentração dos compostos, seguidos de estabilização ou mesmo decréscimo após o que se observa novo aumento.

Verifica-se que os flavonóis glicosilados F3, F5 e F10 têm uma forte correlação com o tempo ($0,6 < |r| < 0,9$), os flavonóis glicosilados F2 e F6 têm uma correlação moderada ($0,3 < |r| < 0,6$) e os os flavonóis glicosilados F4 e F7+F8+F9 têm uma correlação fraca ($|r| < 0,3$).

Os flavonóis e seus glicosídeos são os principais constituintes responsáveis pela cor das infusões de chá (Vidya & Julkarni, 2002). No chá, os flavonóis estão normalmente ligados a açúcares como O-glicosídeos, tais como quercetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo e campferol 3-O-rutinosídeo (Aherne & O'Brien, 2002; Wu *et al.*, 2012). Em comparação

com as catequinas e as teoflavinas, estudos mostram que os flavonóis glicosilados mesmo em concentrações muito baixas (de 0,001 a 19,8 mM), conferem ao chá um sabor aveludado e uma sensação de boca seca e rugosa (Scharbert *et al.*, 2004). Além disto, o tipo de flavonol e o tipo e sequência dos monossacarídeos na sequência da cadeia glicosídica são factores que influenciam a percepção de adstringência no chá (Scharbert *et al.*, 2004).

A quercetina é geralmente apontada como sendo o flavonol mais importante, seguido pelo campferol. O teor de miricetina não pode ser desprezado como conteúdo fenólico das folhas de chás (Wang *et al.*, 2001).

Considerando todos os grupos de compostos identificados no chá Broken Leaf verifica-se que os teores de cada um dos grupos de compostos aumenta ao longo do tempo (dos 5 aos 30 minutos), após este tempo os teores de catequinas, as metilxantinas e os flavonóis glicosilados acilados decrescem enquanto os outros grupos continuam a aumentar (Tabela 3.45). A maior percentagem relativa de catequinas no chá preto é obtida aos 30 min com 17,40%, percentagem esta bem inferior em relação aos chás verdes para o mesmo tempo, que era de 54,26%. O contrário se passa em relação às metilxantinas. Para os 60 minutos de infusão a percentagem de metilxantinas nos chás verde e preto é de 22,08 % e de 50,50 %, respectivamente.

As percentagens relativas dos ácidos hidroxibenzoicos, dos hidroxicinâmicos, das flavonas glicosiladas e dos flavonóis glicosilados acilados são comparáveis entre os chás verde e preto estudados.

Tabela 3. 45 - Variação da concentração média de catequinas, metilxantinas, ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas, flavonóis glicosilados acilados e de flavonóis glicosilados com o tempo de infusão (0, 5, 15, 30 e 60 minutos) do chá preto Broken Leaf.

| tempo (min) | Concentração (mg/L) | | | | | | | |
|-------------|---------------------|---------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------|------------------|
| | Catequinas | Metilxantinas | ácidos hidroxibenzóicos | Ácidos Hidroxicinâmicos | Flavonas Glicosiladas | Flavonol Glicosilado Acilado | flavonol glicosilado | Flavonóis totais |
| 0 | 16,00 | 22,72 | 1,33 | 2,41 | 6,21 | 7,80 | 21,14 | 77,62 |
| 5 | 26,29 | 122,25 | 11,57 | 7,48 | 9,89 | 11,40 | 44,75 | 233,62 |
| 15 | 28,65 | 137,70 | 16,92 | 10,07 | 11,21 | 13,94 | 60,63 | 279,12 |
| 30 | 62,28 | 174,19 | 18,64 | 10,33 | 12,68 | 15,74 | 64,02 | 357,88 |
| 60 | 40,27 | 172,47 | 19,70 | 11,93 | 14,43 | 15,61 | 67,11 | 341,51 |

O teor de flavonoides glicosilados nos chás verdes e pretos, ao fim de 60 minutos de infusão, é de 94,19 e de 67,11 mg/L, respectivamente.

Foi relatado que os flavonóis glicosilados não são afectados pela polifenol oxidase (Finger *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2001) razão pela qual as diferenças do teor dos compostos glicosilados entre chá verde e chá preto se devem a questões de ordem da cultura e uso da planta chá (local, idade das folhas utilizadas, estação da colheita), uma vez que a nível geográfico e climatérico não deve haver variações por serem ambos os chás analisados oriundos dos Açores e da mesma região. Assim, para os 60 minutos de infusão, as flavonas glicosiladas, os flavonóis glicosilados acilados e os flavonóis glicosilados passaram de 17,87 mg/L, 14,34 mg/L e 94,19 mg/L para os 14,43 mg/L, 16,61 mg/L e 67,11 mg/L, respectivamente.

O controlo do tempo de infusão é importante nas propriedades funcionais do chá mas também em relação às propriedades organolépticas.

Estudos utilizando língua a nariz electrónicos (Buratti *et al.*, 2013) definiram as características do chá preto, quanto ao sabor e ao aroma. Assim o aumento do tempo de infusão, de 3-5 minutos para 10 minutos levou a que o chá preto ficasse com um sabor mais amargo, azedo, salgado e adstringente. Quanto ao aroma, o aumento de tempo de infusão conferiu-lhe um excelente aroma (Buratti *et al.*, 2013).

Outro estudo (Scharbert & Hofmann, 2005) verificou que os compostos responsáveis pelo sabor do chá preto são a cafeína que tem um sabor amargo, nove flavonóis-3-glicósídeos com um sabor aveludado mas adstringente, a catequina com sabor adstringente e a epigallocatequina-3-galato que é adstringente e amarga. Estudos demonstraram que os flavonol-3-glicosídeos não só conferem uma sensação aveludada e um sabor adstringente na cavidade bucal, mas também contribuem para o sabor amargo de infusões de chá, amplificando a amargura de cafeína (Scharbert & Hofmann, 2005). De acordo com outro estudo (Peleg *et al.*, 1999) as catequinas (flavan-3-ol) têm uma amargura persistente e adstringência, sendo os monómeros com um sabor amargo mais forte e a adstringência maior quanto maior for o polímero de catequina.

3.3.3.3 - Compostos fenólicos presentes nos extractos aquosos preparados com um tempo de fervura de 1 hora

O método de obtenção do extracto aquoso corresponde ao método oficial alemão para a determinação do teor de sólidos solúveis (1 hora de fervura sob refluxo) (Yoshida *et al.*, 1999; Zuo *et al.*, 2002). Este foi aplicado aos chás verdes e chás pretos, os quais foram analisadas a três comprimentos de onda específicos 280 nm, 320 nm e 360 nm.

3.3.3.3.1 - Chás Verdes

- Análise a 280 nm

Os compostos identificados ao comprimento de onda de 280 nm nos extractos aquosos provenientes de chás verdes estão listados na tabela 3.46.

Tabela 3. 46 - Compostos tentativamente identificados em extractos aquosos de chás verdes ao comprimento de onda de 280 nm. Tabela

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| Ácidos hidroxibenzoicos | | | | |
| A1 | Ácido gálico* | 15,85 – 16,69 | 5,46 – 41,86 | 237, 270 |
| A2 | Ácido 5-galoilquinico | 17,35 – 18,20 | 2,28 – 10,64 | 239, 274 |
| A16 | Isómero do ácido protocatecuico | 63,36 – 64,88 | 0,90 – 5,57 | 237, 261, 298 |
| Catequinas | | | | |
| A4 | Galocatequina + Ác Protocatecuico* | 22,95 – 23,73 | 31,12 – 119,07 | 228, 243, 269; 240, 259, 293 |
| A6 | Isómero da galocatequina 1 | 35,22 – 37,34 | 10,36 – 20,09 | 242, 270 |
| A8 | Epicatequina | 46,60 – 47,21 | 17,25 – 50,41 | 242, 279 |
| A9 | Epigalocatequina-3-galato* | 47,36 – 48,01 | 6,01 – 87,78 | 271, 274 |
| A10 | Galocatequina-3-galato * | 50,98 – 51,70 | 1,84 – 64,52 | 242, 274 |
| A14 | Isómero da catequina-3-galato 1 | 52,42 – 54,67 | 1,34 – 5,44 | 240, 278 |
| A12 | Epicatequina-3-galato* | 57,81 – 58,50 | 2,00 – 23,37 | 241, 277 |
| A15 | Isómero da catequina-3-galato 2 | 59,26 – 60,06 | 0,81 – 11,32 | 240, 279 |
| Metilxantinas | | | | |
| A3 | Teobromina | 22,40 – 16,69 | 9,82 – 25,28 | 241, 272 |
| A13 | Teofilina | 26,09 – 27,42 | 6,80 – 16,34 | 242, 272 |
| A7 | Cafeína* | 37,93 – 39,17 | 79,60 – 109,09 | 240, 272 |

*compostos identificados por comparação com padrões

Além dos picos identificados nas infusões de 15 minutos (picos de A1 a A12) foram ainda identificados quatro novos compostos.

O pico A13 (tR entre 26,09 e 27,42 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 272 nm) com base no cromatograma e no perfil cromatográfico foi identificado como uma metilxantina, a teofilina. Este composto apresenta em espectro UV-VIS semelhante à cafeína, com um tR superior, e à teobromina, com um tR inferior à teofilina. Este composto foi identificado por outros autores no chá verde (Friedman *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2010).

Os picos A14 (tR entre 52,42 e 54,67 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 278 nm) e A15 (tR entre 59,26 e 60,06 minutos e um $\lambda_{\text{máx}}$ de 279 nm) foram identificados como sendo isómeros da catequinas-3-galato, uma vez que este composto apresenta um perfil cromatográfico e um $\lambda_{\text{máx}}$ semelhantes à catequina-3-galato (padrão real) diferindo apenas nos tempos de retenção.

O pico A16 (tR entre 63,36 e 64,88 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 237, 261 e 298 nm) foi identificado como um isómero do ácido protocatecuico tendo como base o perfil cromatográfico, por comparação com um padrão autêntico. Este composto tem um perfil semelhante, mas um diferente tempo de retenção do ácido protocatecuico.

Nos extractos de chás verdes analisados neste trabalho o composto mais abundante é na sua maioria é a cafeína (79,60 – 109,09 mg/L). Em dois dos extractos, nos chás dos Açores Encosta da Bruma e Folha Enrolada, a cafeína é ultrapassada pela Galocatequina + Ác Protocatecuico (31,12 – 119,07 mg/L), ficando logo a seguir a cafeína.

A distribuição destes compostos e dos vários compostos identificados nos chás analisados está representada nas figuras 3.58 e 3.59.

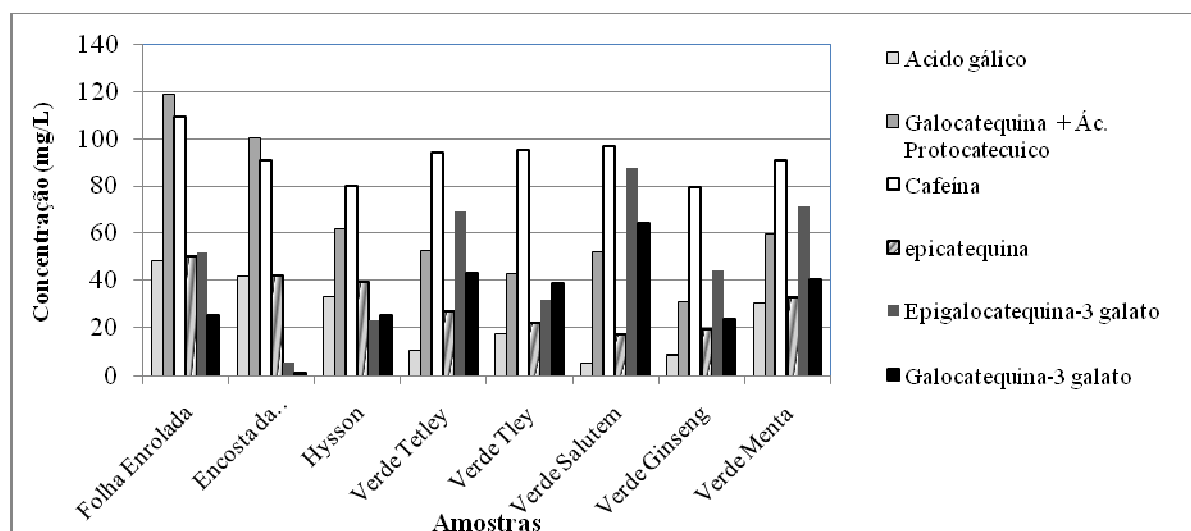


Figura 3. 58 - Concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em algum dos extractos apresentam valores superiores a 40 mg/L

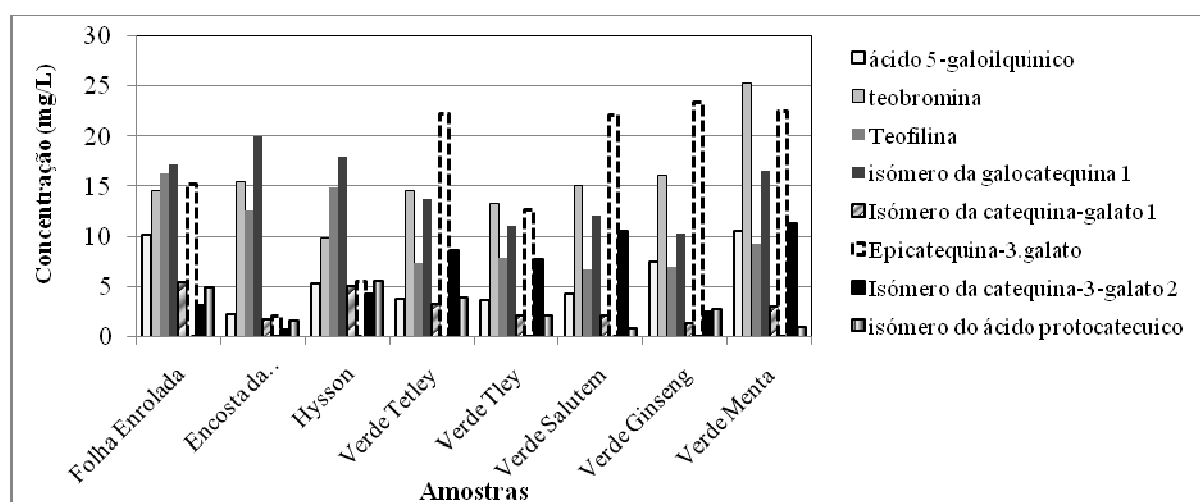


Figura 3. 59 - Concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em nenhum dos extractos apresentam valores superiores a 40 mg/L

Como é conhecido da literatura, os compostos fenólicos podem sofrer alterações graves resultantes da cozedura (Reihle *et al.*, 2013). Autores mostraram que, com aquecimento prolongado a 100°C, metade das catequinas foram destruídas, assim como a miricetina, o campferol e a quercetina. (Zuo *et al.*, 2002; Perva-Uzunalic *et al.*, 2006).

Estudos (Rehman *et al.*, 2002) revelaram que o conteúdo de tanino aumenta com o aumento do tempo. Assim este estudo verificou para 2 min, 4 min e 6 min de fervura, o conteúdo de chá Lipton Danedar de 3,20%, 6,19% e 13,92%, respectivamente, para o chá Lipton Taza de 4,27%, 7,85% e 15,83%, respectivamente, para o chá Lipton Yellow de 2,93%, 6,92% e 6,93%, respectivamente (Rehman *et al.*, 2002). No entanto, a ingestão excessiva de taninos podem causar insónia, náuseas, vômitos, palpitação do coração e uma chávena de chá após a refeição pode causar dificuldade na digestão (Chung *et al.*, 1998).

Uma vez que os taninos são prejudiciais em doses elevadas é necessário evitar a ebulição prolongada. Além disso, prolongar a ebulição diminui em propriedades sensoriais, ou seja, os óleos essenciais responsáveis pelo aroma de chá são perdidos em ebulição devido à volatilidade dos mesmos (Rehman *et al.*, 2002).

As catequinas individuais submetidas a altas temperaturas podem sofrer epimerização. No entanto, nas infusões de chá verde a mudança predominante parece ser epimerização da estrutura epi- para a estrutura não-epi-. Neste estudo foi verificado ainda que esta epimerização ocorre mais facilmente com água da torneira do que com água purificada. A complexidade dos íons na água da torneira é diferente da existente na água purificada daí pensar-se serem essas as principais razões para as taxas de conversão das catequinas individuais (Wang & Helliwell, 2000a). Esta constatação foi verificada por outros estudos (Petisca *et al.*, 2009; Riehle *et al.*, 2013). Outros estudos mostraram que enquanto as catequinas com estrutura epi- diminuíram a sua concentração em solução, as correspondentes estruturas não-epi- aumentaram exponencialmente com o tempo, ou seja, a taxa de aumento das não-epicatequinas apresentou uma tendência semelhante para a taxa de diminuição das epicatequinas, isto é, a taxa de epimerização aumentou com o aumento da temperatura (Wang *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou que as quatro catequinas com configurações cis- (EGCG, EGC, ECG, e CE) se degradam ao longo do tempo de forma aparentemente exponencial (degradações de 65% a 85%), enquanto as duas catequinas com configurações trans- (GCG e GC), inicialmente, aumentam (cerca de 20% para a galocatequina galato e de 40% a catequina galato) e, em seguida, é atingido um patamar após 90 min (Li *et al.*, 2012). É provável que um aquecimento mais prolongado vá provocar uma diminuição nas catequinas com configurações trans- como é observado por vários autores. A razão desta diferença de comportamento deveu-se provavelmente à forma de preparação da amostra. A cauda da degradação dos polifenóis é provavelmente a combinação de várias reacções, nomeadamente, epimerização, oxidação e polimerização.

Correlacionando estes compostos identificados a este comprimento de onda (280 nm) com os fenólicos totais verifica-se que as correlações são fracas com a excepção dos compostos isómero da galocatequina 1 (A6), cafeína (A7), isómero da catequina-3-galato 1 (A14) e isómero do ácido protocatecuico (A16) que apresentam correlações moderadamente fortes ($0,3 < |r| < 0,6$).

Considerando a média dos grupos de compostos identificados, a 280 nm, em todos os chás verdes analisados verifica-se que a composição média dos seus extractos aquosos tem como maior percentagem as catequinas, seguida das metilxantinas e dos ácidos hidroxibenzoicos, no entanto, a distribuição destes grupos de compostos não é igual para todos os chás analisados (tabela 3.47).

Tabela 3. 47 - Concentração média, em mg/L, de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzóicos dos extractos aquosos de chá verde

| Tipo de chá | Ácidos Hidroxibenzóicos | Metilxantinas | Catequinas |
|------------------|-------------------------|---------------|------------|
| Folha Enrolada | 63,45 | 139,97 | 287,85 |
| Encosta da Bruma | 45,75 | 118,94 | 175,28 |
| Hysson | 44,05 | 104,86 | 182,57 |
| Verde Tetley | 18,06 | 116,10 | 239,33 |
| Verde Tley | 23,29 | 116,31 | 169,19 |
| Verde Saludem | 10,69 | 118,79 | 268,92 |
| Verde Ginseng | 19,09 | 102,64 | 155,84 |
| Verde Menta | 42,07 | 125,62 | 258,14 |

Por comparação dos teores das catequinas dos extractos com as infusões dos chás verdes verifica-se que estes diminuíram de uma média de 472,32 mg/L nas infusões de 15 minutos para um teor médio de 217,14 mg/L. Esta diminuição de conteúdo em catequinas, deve-se possivelmente à sua

destruição/degradação pela fervura (Zuo *et al.*, 2002), pois estudos mostraram que as catequinas podem sofrer oxidação e/ou polimerização a altas temperaturas diminuindo as suas concentrações em solução muito rapidamente (Kumatsu *et al.*, 1993, citado por Ito *et al.*, 2003).

Esta situação de diminuição do teor de conteúdo foi verificado também com as metilxantinas, cuja concentração média das infusões de 15 minutos de chás verdes foi de 166,42 mg/L e nos correspondentes extractos foi de 117,90 mg/L.

Em relação aos ácidos benzóicos a situação foi contrária, a média dos teores encontrados nas infusões de 15 minutos foi de 24,98 mg/L e de 33,31 mg/L para os extractos aquosos. Isto deve-se possivelmente ao aparecimento de ácido gálico, uma vez que este é um produto da destruição, por acção do calor, das catequinas (Lee *et al.*, 2010) e ao aparecimento do ácido protécico e seu isómero o qual é um produto de reacção da clivagem/degradação de flavonoides de quercetina (Buchner *et al.*, 2006).

- Análise a 320 nm e a 360 nm

A análise a 320 e a 360 nm por HPLC revelou cromatogramas com picos grandes relativamente ao total do cromatograma a um dado comprimento de onda mas com intensidades bastante menores às verificadas até aqui, tornando-se difícil definir a correspondência entre cada pico e o espectro de um determinado composto. Assim, optou-se por analisar o total de compostos fenólicos identificados a cada um dos comprimentos de onda, utilizando como teor dos mesmos a soma das áreas absolutas determinadas na análise realizada.

Comparando os somatórios obtidos para cada chá verde para as infusões de 15 minutos e para os extractos aquosos verifica-se que, quer a 320 nm quer a 360 nm (figuras 3.60 e 3.31), existe uma redução mais ou menos acentuada de acordo com o chá analisado.

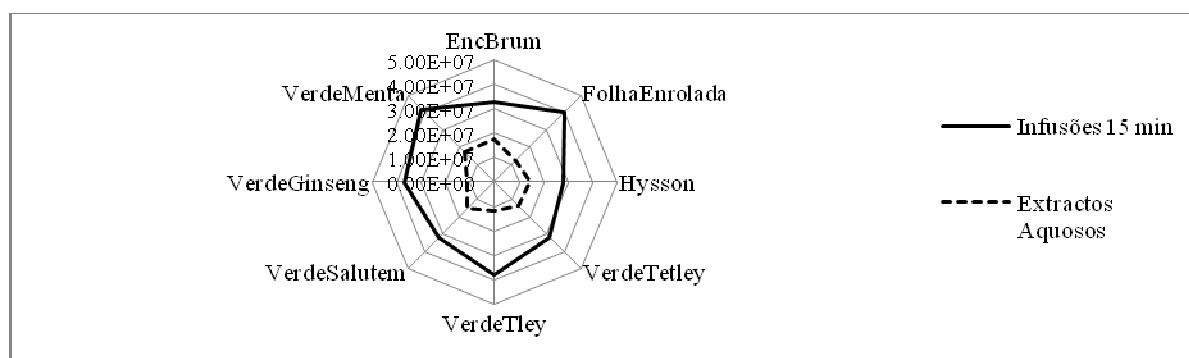


Figura 3. 60 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 320 nm correspondente aos compostos de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis acilados glicosilados identificados em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos.

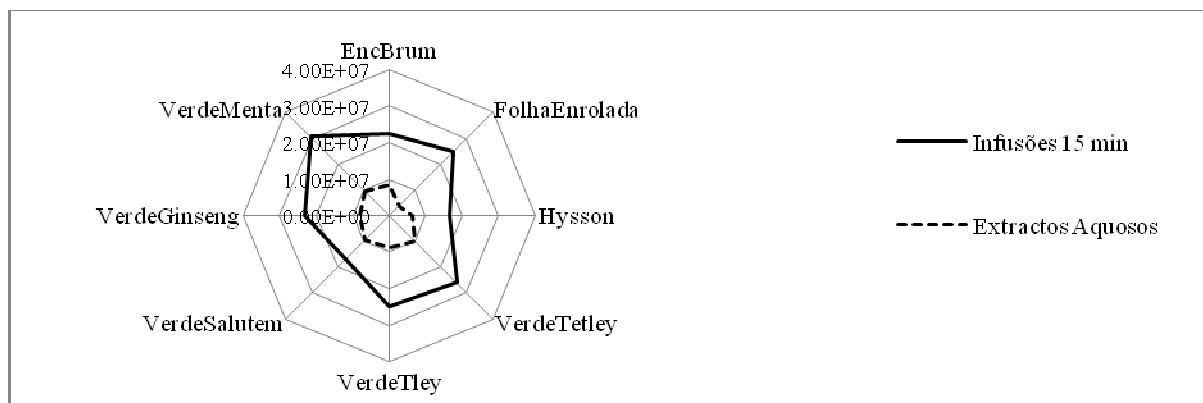


Figura 3. 61 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 360 nm correspondente aos compostos de flavonóis glicosilados identificados em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos.

Esta redução foi verificada por outros autores. Um estudo mostrou haver redução dos flavonóides, por fervura dos alimentos. Foi mostrado nesse estudo que fervendo 10 g de tomates em 250 mL de água e 10 g de cebolas em 250 mL de água durante 15 minutos, o teor de quercetina e seus derivados era reduzido de $7,1 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ para $1,3 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ e de $342 \pm 12 \mu\text{g/g}$ para $87 \pm 7,2 \mu\text{g/g}$ nos tomates e nas cebolas, respectivamente (Crozier *et al.*, 1997).

Por ANOVA, verificamos que os extractos aquosos de chás verdes analisados a 280 nm e a 320 nm não apresentam diferenças significativas entre eles no entanto, a 360 nm, os extractos dos chás dos Açores apresentam teores significativamente inferiores aos chás verdes comerciais simples ($p < 0,05$).

3.3.3.2 - Chás Pretos

Os compostos identificados ao comprimento de onda de 280 nm nos extractos aquosos provenientes de chás pretos estão listados na tabela 3.48.

Tabela 3. 48 - Compostos tentativamente identificados em extractos aquosos de chás verdes ao comprimento de onda de 280 nm.

| Pico | Nome do Composto | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/L) | $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm) |
|--------------------------------|--|---------------------------|----------------------|------------------------------|
| Ácidos hidroxibenzoicos | | | | |
| D1 | Ácido hidroxibenzoico | 8,07-8,77 | 0,00 – 1,56 | 234, 266 |
| D2 | Acido gálico* | 16,10-16,80 | 6,36-59,96 | 238, 270 |
| D3 | Ácido 5-galoilquinico | 17,67-18,25 | 0,08-4,73 | 239, 274 |
| D15 | Derivado ácido protocatecuico | 63,14-64,42 | 0,00-9,47 | 256, 292 |
| D16 | Derivado do ácido p-hidroxibenzoico | 71,82-73,54 | 1,15-4,28 | 210, 253 |
| Catequinas | | | | |
| D7 | Composto fenólico desconhecido (catequina) | 42,77-44,12 | 8,59-11,05 | 241,295 |
| D8 | Epicatequina * | 46,50-47,98 | 12,40-32,93 | 242, 279 |
| D11 | Teoflavina-3-galato | 77,71-80,32 | 0,00-27,75 | 233, 266, 371, 450 |
| D12 | Cinamaldeído | 79,18-79,38 | ----- | 238, 289 |
| Metilxantinas | | | | |
| D4 | Teobromina | 22,39-23,00 | 0,89-5,90 | 241, 272 |
| D5 | Teofilina | 26,80-28,08 | 0,52-4,99 | 242, 272 |
| D6 | Cafeína* | 38,27-39,27 | 36.18-104,85 | 240, 272 |

*compostos identificados por comparação com padrões

Além dos picos identificados nas infusões de 15 minutos (picos de D1 a D14) foram ainda identificados dois novos compostos.

O pico D15 (tR entre 63,14 e 64,42 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 292 nm) foi identificado como um derivado do ácido protocatecuico tendo como base o perfil cromatográfico, por comparação com um padrão autêntico. Este composto tem um perfil semelhante, mas um diferente tempo de retenção do ácido protocatecuico.

O pico D16 (tR entre 71,82 e 73,54 minutos e $\lambda_{\text{máx}}$ de 253 nm) foi identificado como um derivado do ácido p-hidroxibenzoico, por comparação com outros autores (Sakakibara *et al.*, 2003).

A distribuição destes compostos nos vários extractos de chás pretos analisados está representada nas figuras 3.62 e 3.63.

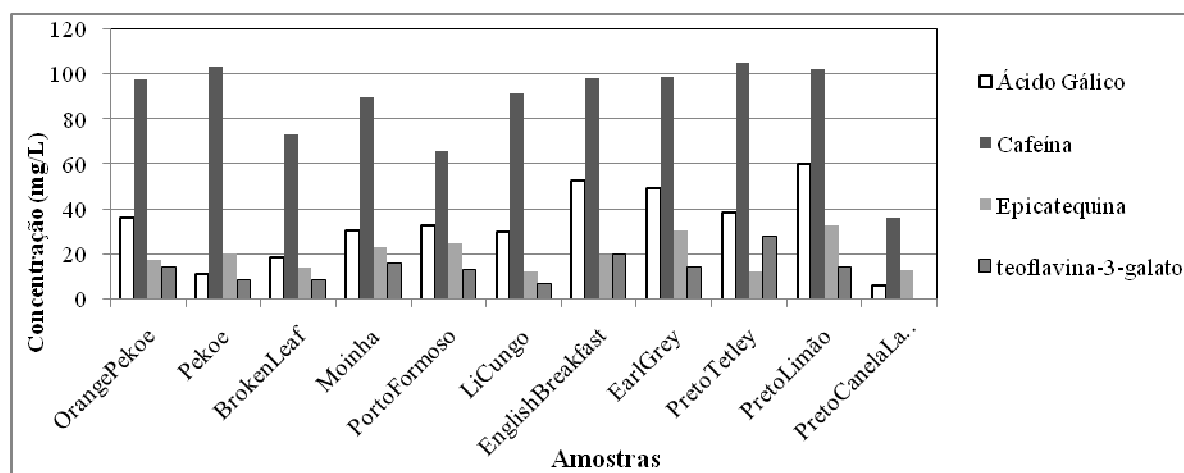


Figura 3. 62 - Gráfico com as concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em algum dos extractos apresentam valores superiores a 20 mg/L

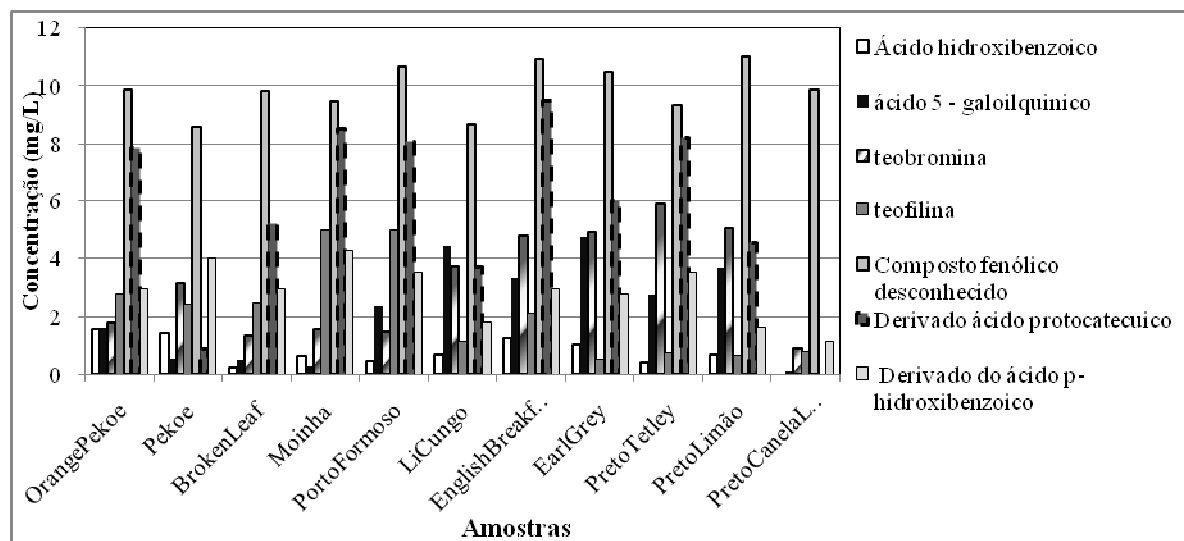


Figura 3. 63 - Gráfico com as concentrações individuais (mg/L), dos componentes que em nenhum dos extractos apresentam valores superiores a 20 mg/L

O composto mais abundante nestes extractos é a cafeína (36.18-104,85 mg/L).

À semelhança do que se verifica nos extractos aquosos de chá verde, os extractos de chás pretos apresentam teores dos compostos metilxantinas e catequinas inferiores às respectivas infusões de 15 minutos, nomeadamente passam de teores médios dos chás de 149,72 mg/L e de 45,76 mg/L, nas

infusões para 92,38 mg/L e de 29,97 mg/L nos extractos, respectivamente. Em relação às teoflavinas o seu teor médio aumentou de 6,99 mg/L para 13,05 mg/L, o que possivelmente corresponde a uma maior dissolução dos compostos por acção do calor e a um aumento da polimerização das catequinas.

Estudos (Su *et al.*, 2003) sobre a estabilidade das catequinas e teoflavinas mostraram que a estabilidade destes compostos é variável. A epigallocatequina-3-galato (EGCG) e epigallocatequina (EGC), são completamente degradadas em 6 h de incubação a 100°C, enquanto epicatequina (EC) e epicatequina-3-galato (ECG), apenas foram degradadas cerca de 35%. Quanto às teoflavinas verificaram que a teaflavina-3,3'-digalato e a teaflavina-3'-galato são, geralmente, mais estáveis do que teaflavina-1 e a teaflavina-3-galato em água fervente, no entanto menos estáveis que as catequinas. As teaflavina-3,3'-digalato e a teaflavina-3'-galato são completamente degradadas ao fim de 4 horas, enquanto as teaflavina-1 e a teaflavina-3-galato estão completamente degradadas ao fim de 2 horas (Su *et al.*, 2003).

Mas não só os efeitos induzidos termicamente são capazes de levar à degradação dos compostos fenólicos nas infusões de chá. Outros factores devem ser considerados, como por exemplo, as reacções de complexação entre os compostos fenólicos e cafeína e uma precipitação dos correspondentes compostos fenólicos pode ocorrer mesmo na bebida quente (D'Amelio *et al.*, 2009; Roberts, 1963). Partículas grandes em elevadas concentrações no chá podem promover este efeito de complexação chamado de desnatação no chá preto (Jöbstl *et al.*, 2005).

A formação deste depósito chamado de “nata do chá” formado por um complexo de cafeína e teorrubiginas e teoflavinas é utilizado por provadores de chá preto como indicação da força e da vivacidade da infusão. A cor do creme pode variar do laranja ao castanho. A avaliação visual da quantidade e cor do creme formado numa infusão tem como finalidade a percepção das proporções de teorrubiginas, teoflavinas e cafeína no chá e consequentemente uma indicação das qualidades do chá (Roberts, 1963). A glicosilação do polifenol diminui a auto-associação e reduz a ligação à cafeína, e consequentemente reduz a formação da “nata do chá” (Jobstl *et al.*, 2005).

A temperatura à qual se inicia a formação desta nata com a extracção destes componentes da infusão e com a turvação a ser significativa varia entre os 50°C e 60°C. A extractibilidade do chá aumenta com o aumento da temperatura (Liang & Xu, 2003).

A extracção das teorrubiginas, facilmente extraíveis a temperaturas elevadas, e a agregação com outros constituintes da nata, tais como as teoflavinas e a cafeína, forma partículas que precipitam quando a infusão arrefece aumentando a turbidez da infusão (Liang & Xu, 2003).

Correlacionando estes compostos identificados a este comprimento de onda (280 nm) com os fenólicos totais verifica-se que as correlações são fortes ($0,6 < |r| < 0,9$) com os compostos de ácido gálico (D2), ácido 5-galoilquinico (D3) e cafeína (D4).

Considerando a média dos grupos de compostos identificados, a 280 nm, em todos os chás pretos analisados verifica-se que a composição média dos seus extractos aquosos tem como maior percentagem as metilxantinas, seguida dos ácidos hidroxibenzoicos, das catequinas e das teoflavinas, no entanto, a distribuição destes grupos de compostos não é igual para todos os chás analisados (tabela 3.49).

Tabela 3. 49 - Concentração média, em mg/L, de catequinas, metilxantinas e ácidos hidroxibenzoicos dos extractos aquosos de chá verde

| | Ác. Hidroxibenzoicos | Metilxantinas | Catequinas | Teoflavinas |
|--------------------|-------------------------|---------------|------------|-------------|
| OrangePekoe | 50,18 | 101,66 | 27,36 | 14,31 |
| Pekoe | 18,17 | 108,32 | 28,73 | 8,74 |
| BrokenLeaf | 27,77 | 76,79 | 24,12 | 8,56 |
| Moinha | 44,52 | 96,20 | 32,38 | 15,75 |
| PortoFormoso | 47,34 | 72,04 | 35,56 | 12,96 |
| LiCungo | 40,88 | 95,83 | 21,22 | 6,98 |
| EnglishBreakfast | 69,43 | 104,82 | 30,96 | 20,03 |
| EarlGrey | 63,77 | 103,83 | 41,07 | 14,49 |
| PretoTetley | 53,33 | 111,51 | 21,73 | 27,75 |
| PretoLimão | 70,48 | 107,33 | 43,98 | 13,96 |
| PretoCanelaLaranja | 7,59 | 37,85 | 22,59 | 0,00 |

- Análise a 320 nm e a 360 nm

Conforme referido para os extractos aquosos de chás verdes, a análise a 320 e a 360 nm por HPLC revelou cromatogramas com intensidades reduzidas impossibilitando a correspondência entre cada pico e o espectro de um determinado composto. Assim, mais uma vez, se optou por analisar o total de compostos fenólicos identificados a cada um dos comprimentos de onda, utilizando como teor dos mesmos a soma das áreas absolutas determinadas na análise realizada.

Comparando os somatórios obtidos para cada chá preto para as infusões de 15 minutos e para os extractos aquosos verifica-se que, quer a 320 nm quer a 360 nm (figuras 3.64 e 3.65), existe uma redução mais ou menos acentuada de acordo com o chá analisado.

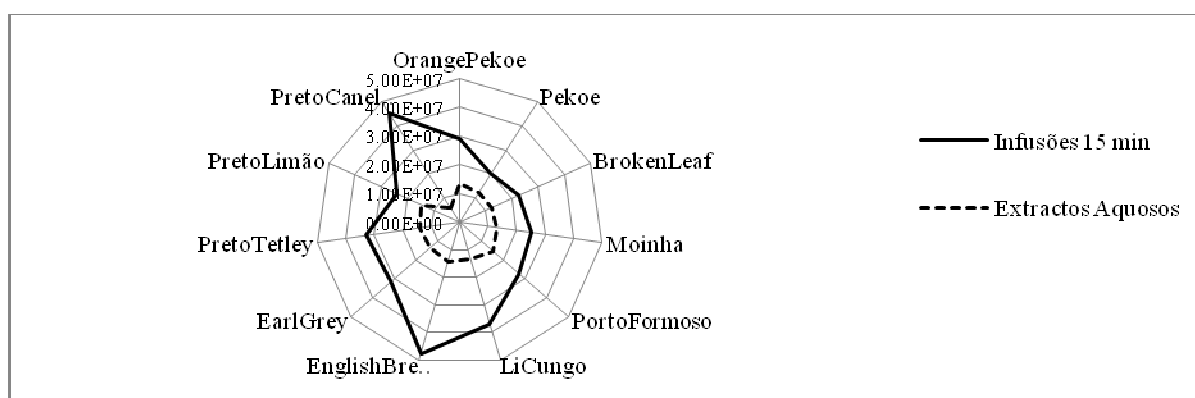


Figura 3. 64 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 320 nm correspondente aos compostos de ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis acilados glicosilados identificados em cada tipo de chá verde nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos.

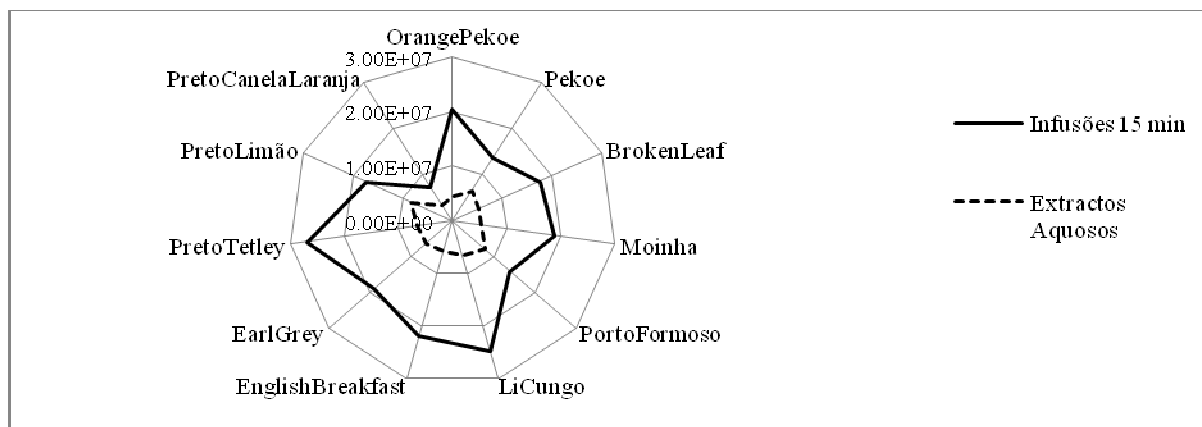


Figura 3. 65 – Somatório das áreas absolutas determinadas em HPLC-DAD a 360 nm correspondente aos compostos de flavonóis glicosilados identificados em cada tipo de chá preto nas respectivas infusões de 15 minutos e extractos aquosos.

Por ANOVA, verificamos que os extractos aquosos de chás pretos analisados a 280 nm, a 320 nm e a 360 nm não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$).

Os extractos aquosos provenientes dos chás verdes e pretos apresentam diferenças significativas a 320 nm entre os chás pretos comerciais aditivados e o Verde dos Açores, tendo este último valores significativamente superiores. A 360 nm, os chás pretos dos Açores e os comerciais aditivados são significativamente inferiores aos chás verdes comerciais, destes, os simples são significativamente superiores do chá verde dos Açores e do chá preto comercial simples.

Por correlação de Pearson (linear) verifica-se que o teor de fenólicos totais no extracto aquoso está moderadamente relacionado com os somatórios a 280 nm, a 320 nm e a 360 nm ($0,3 \leq |r| < 0,6$).

Comparando os somatórios médios para os dois tipos de chás (verde e preto), para cada tipo de extracção (infusões de 15 minutos e extractos aquosos) e considerando os três comprimentos de onda analisados (280, 320 e 360 nm) verifica-se que os compostos que sofreram uma maior redução nas soluções foram os compostos identificados a 280 nm, essencialmente, as catequinas, principalmente os chás verdes (Figura 3.66).

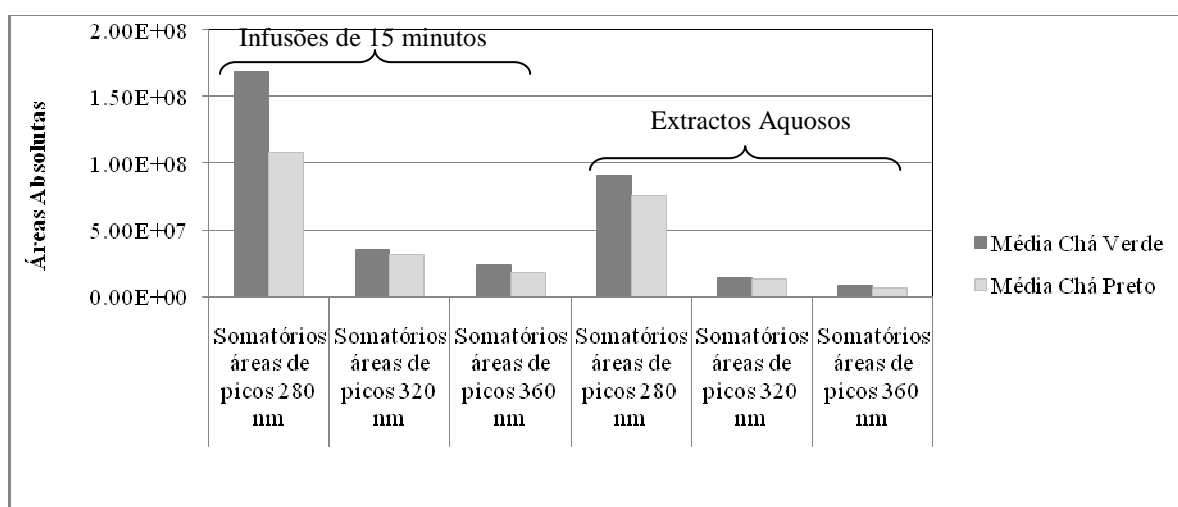


Figura 3. 66 – Somatório das áreas absolutas médias dos chás verde e preto determinadas em HPLC-DAD aos comprimentos de onda utilizados na identificação de compostos (280 nm, 320 nm e 360 nm) para as infusões de 15 minutos e os extractos aquosos.

Verifica-se pelas correlações de Pearson que as infusões de 15 minutos e os extractos aquosos estão moderadamente correlacionadas ($0,3 < |r| < 0,6$) a 280 nm e a 360 nm. As correlações são fracas a 320 nm.

3.4 - Conclusões

Este capítulo pretendeu ser uma contribuição para a caracterização da estabilidade dos compostos bioactivos dos chás verdes e pretos durante a sua preparação. Os resultados obtidos sugerem que existem diferenças significativas na composição química de chás verdes e pretos comercialmente disponíveis na Europa. Embora os chás, especialmente os chás verdes, sejam uma fonte rica de compostos bioactivos, a eficiência da extracção destes compostos depende fortemente das condições de extracção.

Vários estudos têm demonstrado que, as variações no teor de polifenóis de chá comerciais são o resultado de um grande número de factores, nomeadamente, a variedade, a composição e a idade da cultura, a transformação industrial (fermentação e moagem) e o armazenamento. Estas diferenças são acentuadas pelo processo de infusão (Samaniego-Sanchez *et al.*, 2011). A temperatura da água e do tempo de infusão são condições cruciais que determinam o teor de polifenóis e, como consequência, a capacidade antioxidante das infusões de chá verde (Samaniego-Sanchez *et al.*, 2011). O conteúdo fenólico é também influenciado pelo tipo de água utilizado, pelo uso de folhas soltas ou de chá ensacado (doses individuais) ou chá em pó, pela quantidade de chá em relação à quantidade de água (Buratti *et al.*, 2013).

Pela análise dos chás verdes dos Açores, os quais se encontram comercialmente disponíveis em folha solta, verificou-se que existem diferenças significativas nos teores de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), na capacidade antioxidante (DPPH^{*}) e no poder redutor férrico (FRAP) quando comparados com infusões preparadas a partir de folhas de chá previamente moídas, mantendo todas as outras condições.

No que respeita às propriedades bioactivas, determinadas neste trabalho, verifica-se que estas estão fortemente correlacionadas entre si ($0,60 \leq |r| < 0,90$), principalmente os testes Folin e o DPPH cuja correlação chega a ser extremamente forte ($0,90 \leq |r| < 1,00$) para os 15 e 30 minutos, o que é de alguma forma confirmado com a correlação existente entre os compostos individuais identificados por HPLC nas infusões de 15 minutos e as propriedades antioxidantes. Aí verifica-se que existe uma série de compostos, entre eles a teobromina (A3), galocatequina (A6), epigalocatequina-3-galato (A9), isómero do ácido cumárico (B2) e as três flavonas glicosiladas identificadas (B8, B9, B10) para os chás verdes e o ácido 5-galoilquinico (D3), composto fenólico não identificado (D7), teoflavina-3-galato (D11), isómero do ácido clorogénico (E1), flavonol glicosilado acilado (E14), derivado glicosilado da quercetina (F3), derivado glicosilado da miricetina (F6) e derivado glicosilado do campferol (F11) para os chás pretos, que estão fortemente correlacionados com os dois testes. A relação entre estes dois testes e o teste FRAP apesar de ser forte, não é tão intensa embora vá aumentando ao longo do tempo entre os 5 e 15 minutos e estabilizando entre os 15 e os 30 minutos. Assim, os factores de correlação linear de Pearson entre o FRAP e os outros testes são: para infusões de 5 minutos de 0,70 para Folin e de 0,81 para DPPH^{*}; para infusões de 15 minutos é de 0,87 para os dois testes (Folin e DPPH^{*}); e para infusões de 30 minutos é de 0,88 para Folin e de 0,86 para o DPPH^{*}. Esta observação deve-se possivelmente à diminuição da velocidade ou mesmo à estabilização da extracção dos compostos fenólicos ao longo do tempo na infusão.

De uma forma global, as propriedades dos chás verdes dos Açores são ligeiramente mais baixas que as mesmas propriedades nos chás comerciais, o que se pode dever ao facto dos chás dos Açores estarem disponíveis em folhas soltas e os chás comerciais estarem disponíveis em folhas moídas. No entanto,

este teor ligeiramente mais baixo pode não ser um factor negativo uma vez que, sendo os compostos fenólicos, principalmente as catequinas, responsáveis pelo sabor adstringente e amargo, o chá dos Açores apresenta um sabor mais suave que os outros chás comerciais.

Os principais compostos bioactivos nos chás verdes são - à semelhança de vários estudos - as catequinas, com 61% e as metilxantinas, com 22% (compostos identificados a 280 nm), sendo o composto que apresenta maior teor a epigallocatequina-3-galato, seguido da cafeína, da epigallocatequina e da epicatequina.

Nos chás verdes dos Açores verifica-se que os compostos maioritários são igualmente as catequinas, com 58%, e as metilxantinas, com 23%. Estas variações, pela figura 3.19, devem-se possivelmente à diferença de conteúdo de epigallocatequina-3-galato entre os chás dos Açores e os outros chás verdes analisados. Isto pode ser explicado uma vez que o chá dos Açores se apresenta comercialmente sob a forma de folhas soltas e consequentemente com menor superfície de contacto para o processo de extracção e, além disso, as catequinas galato, por serem estruturas maiores, são mais dificilmente extraídas que outros compostos como as catequinas não galato e metilxantinas (Grazma *et al.*, 2005). Os chás verdes dos Açores apresentam ainda uma maior percentagem de ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, flavonóis glicosilados e flavonóis glicosilados acilados (figura 3.30).

Os principais compostos bioactivos nos chás pretos são as metilxantinas, com um teor médio dos chás analisados de 42% (compostos identificados a 280 nm), os flavonóis glicosilados, com um teor médio de 20% (compostos identificados a 320 nm) e as catequinas, com um teor médio de 13% (compostos identificados a 280 nm), sendo o composto que apresenta maior teor a cafeína.

Os mesmos compostos maioritários são determinados nos chás pretos dos Açores em que temos 43% de metilxantinas, 24 % de flavonóis glicosilados e 12 % de catequinas. Assim estes chás são mais ricos em flavonóis glicosilados que os chás comerciais, compostos estes que são um grupo de polifenóis de elevada actividade fisiológica, em especial o efeito da vitamina P e o efeito hipertensivo (Miean & Mohamed, 2000) e redução de doenças cardiovasculares (Asif & Khodadadi, 2013).

Verifica-se que, como resultado da fermentação do chá, as catequinas são significativamente reduzidas devido à sua transformação em teoflavinas e teorrubiginas (Rahim *et al.*, 2014; Sang *et al.*, 2011). Esta redução do teor de catequinas resulta numa perda de conteúdo fenólico soluvel total, determinado pelos teste Folin-Ciocalteu, capacidade antioxidante (teste DPPH^{*}) e poder férrico (FRAP), o que pode ser conferido pelas figuras 3.9, 3.10 e 3.11. A perda da capacidade antioxidante e do poder férrico foi provavelmente devido à degradação térmica ou oxidativa de antioxidantes, como por exemplo a cafeína, polifenóis não catequina (flavonóis glicosídeos) em vez da conversão das catequinas em teoflavinas durante o processo de fermentação (Kim *et al.*, 2011).

Como se verificou que o facto de o chá dos Açores ser em folha podia ser limitativo para a extracção dos compostos nas infusões de 15 minutos foi feito o estudo da extracção desses compostos ao longo do tempo, quer para um chá verde, o Encosta da Bruma, quer para um chá preto, o Broken Leaf. Para o chá Encosta da Bruma verifica-se que todos os compostos identificados aumentam a sua concentração até aos 15 minutos, dos 15 aos 30 minutos os compostos identificados aumentam ou estabilizam e, após os 30 minutos, o crescimento da concentração dos compostos faz-se notar para todos eles excepto para a epigallocatequina e para a galocatequina-3-galato, que se verifica um pequeno decréscimo. Para o chá Broken Leaf verifica-se um aumento dos teores dos compostos identificados dos 0 aos 5 minutos e, a partir daí, o comportamento de extracção depende de composto para composto, observando-se estabilização ou mesmo decréscimo do teor na infusão, após o qual se verificam novamente aumentos do teor. Este comportamento foi verificado também por Ramalho e colaboradores (2013), conforme

referido anteriormente, e que é provavelmente causado pelo processo de fermentação do chá. Pela oxidação, polimerização e degradação que ocorrem durante a fermentação existe a produção de novos compostos e alteração de ligações que podem provocar a alteração da estrutura da folha facilitando-se a solubilização/dissolução dos componentes mais superficiais e dificultando os mais internos, tendo estes de migrar através da estrutura da folha fermentada.

Foi ainda estudado, o perfil de fenólicos e determinados os seus teores nos extractos aquosos. Este estudo foi realizado, porque o extracto aquoso é um parâmetro de qualidade do chá e além disso existem países como o Paquistão e a Índia em que o chá é preparado por fervura das folhas durante algum tempo (Rehman *et al.*, 2002). Verificou-se que, uma hora de fervura com refluxo da infusão de chá, quer seja verde ou preto, reduziu significativamente o teor de todos os polifenóis identificados. Esta observação está relacionada com: a degradação dos compostos por quebra de ligações levando à formação de compostos mais simples, como é o caso, por exemplo, da degradação das catequinas (Lee *et al.*, 2010) e dos flavonóides glicosilados (Buchner *et al.*, 2006); a isomerização das catequinas (Riehle *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012); oxidação e polimerização das catequinas e teoflavinas (Kumatsu *et al.*, 1993 citado por Ito *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003); complexação com iões metálicos (Wang & Helliwell, 2000a); a formação da nata do chá (Jobstl *et al.*, 2005; Liang & Xu, 2003).

Neste capítulo foram identificados compostos nos chás dos Açores que, até ao momento, não tinham o sido. Os compostos flavonoides solúveis até agora identificados foram as maioritariamente catequinas, nomeadamente, galocatequina, epicatequina, epigallocatequina-3-galato, epicatequina-3-galato. Além destes compostos foram também identificados ácido gálico, cafeína e teofilina, e o ácido p-cumaroilquinico (Baptista *et al.*, 1998; Baptista *et al.*, 1999; Petisca *et al.*, 2009).

Foram ainda identificados, os seguintes compostos: ácido 5-galoilquinico, teobromina, ácido hidroxicinâmico e três isómeros do ácido cumárico (B2, B3 e B7), dois isómeros do ácido clorogénico (B4 e B13), ácido clorogénico (B5), três flavonas glicosiladas (B8, B9 e B10) e cinco flavonóides glicosilados acilados (B11, B12, B15, B16 e B17), dois flavonóides glicosilados (C1 e C2), dois derivados da quercitina glicosiladas (C3 e C4) e três derivados do capferol glicosilados (C5, C6 e C7).

As teoflavinas e teorubiginas (taninos) do chá preto resultantes da fermentação das folhas de chá para produção do chá preto, por polimerização das catequinas, foram avaliadas de forma indirecta por determinação das propriedades antioxidantes e pela determinação dos fenólicos totais.

Outros grupos de compostos funcionais não foram analisados, porque não está descrita a sua presença no chá apesar de serem detectados em pequenas concentrações por HPLC. Pode, por isso, esta investigação ser uma proposta de trabalho.

Capítulo 4 – Perfil dos compostos fenólicos e propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extractos de chás

4.1 – Introdução

O uso de compostos bioactivos em diferentes sectores comerciais, tais como as indústrias farmacêutica, alimentícia e química indica a necessidade de se parametrizar o método padrão mais apropriado para extrair esses componentes activos a partir de materiais vegetais.

Extractos de muitos tipos de plantas, utilizados como agentes aromatizantes e de tempero em alimentos, têm também sido usadas terapêuticamente durante séculos. Os compostos de enxofre, terpenos e derivados de terpeno, fenóis, ésteres, aldeídos, álcoois e glicósidos têm mostrado funções antimicrobianas e antioxidantes (Sahari & Asgari, 2013).

Os polifenóis presentes nos legumes/verduras, frutas e chás podem prevenir doenças degenerativas, incluindo cancro através da acção antioxidante e/ou a modulação de várias funções da proteína (Sakakibara *et al.*, 2003). Assim, os antioxidantes são compostos que podem atrasar ou inibir a oxidação dos lípidos ou outras moléculas através da inibição da iniciação ou propagação de reacções em cadeia de oxidação principalmente devido às suas propriedades redox, que podem desempenhar um papel importante na adsorção e neutralizar os radicais livres (Zheng & Wang, 2001).

Muitas plantas, vegetais, frutas e chás foram identificadas como tendo um elevado potencial antioxidante e consequentemente recomendado o seu consumo (Katalinic *et al.*, 2006; Sakakibara *et al.*, 2003; Zheng & Wang, 2001).

Em geral, existem duas categorias básicas de antioxidantes: os naturais e os sintéticos.

Recentemente, o interesse de encontrar antioxidantes naturais tem aumentado consideravelmente (Katalinic *et al.*, 2006), de forma à sua utilização em alimentos ou medicamentos, substituindo os antioxidantes sintéticos, os quais estão a ter o seu uso limitado devido à sua carcinogenicidade (Ito *et al.*, 1983 citado por Zheng & Wang, 2001). Na indústria alimentar, antioxidantes sintéticos, tais como o ácido ascórbico e hidroxitolueno butilado (BHT), têm sido amplamente utilizados como aditivos antioxidantes para estabilizar e conservar a frescura, valor nutritivo, sabor e cor dos alimentos em produtos de alimentação animal. No entanto, pelo menos um estudo revelou que o BHT pode ser tóxico, especialmente em doses elevadas (Moure *et al.*, 2001).

Variadíssimas plantas e ervas têm sido utilizadas numa grande variedade de aplicações, desde os fins medicinais, passando por aromas, bebidas, tingimento, repelentes, perfumes, cosméticos, e usos industriais (Zheng & Wang, 2001). Este crescente interesse na substituição de antioxidantes sintéticos por naturais tem fomentado a investigação de fontes vegetais e novas formas de análise das matérias-primas na identificação de novos antioxidantes (Moure *et al.*, 2001).

Os fenóis bioactivos, especialmente bioflavonóides, são muito interessantes como antioxidantes por causa de sua origem natural e à sua capacidade de actuar como eficientes sequestradores de radicais livres (Katalinic *et al.*, 2006). Como referido, as reacções de oxidação não são uma preocupação exclusiva da indústria alimentar sendo os antioxidantes necessários para evitar a deterioração de bens oxidáveis, tais como cosméticos, produtos farmacêuticos e plásticos. Os polifenóis são os principais compostos com actividade antioxidante nas plantas, embora não sejam os únicos (Moure *et al.*, 2001).

A recuperação de compostos antioxidantes a partir de materiais de plantas é normalmente realizada através de diferentes técnicas de extracção tendo em conta a sua química e distribuição irregular na planta matriz (Sultana *et al.*, 2009).

O chá (preto e verde) é uma das bebidas mais consumidas no mundo e é rica em compostos polifenólicos conhecidos coletivamente como os flavonóides do chá.

Todos os métodos analíticos para a quantificação de compostos biologicamente activos presentes nas folhas de chá envolvem a extracção, separação e análise (Friedman *et al.*, 2006; Rusak *et al.*, 2008).

A extracção de polifenóis não é um processo fácil. Existem duas razões principais. A primeira razão deve-se ao facto destes compostos terem estruturas diferentes e consequentemente propriedades diferentes no que respeita a solubilidade e interacções. As interações com outros componentes alimentares não são totalmente conhecidas, e esta é uma informação muito importante para a selecção de um solvente e condições de extracção. Em segundo lugar, os polifenóis são susceptíveis de sofrer oxidação e polimerização e, a altas temperaturas e meio alcalino sofrerem degradação, e assim haver alteração das propriedades dos polifenóis (Druzynska *et al.*, 2007).

O método de extracção deve permitir a extracção completa dos compostos de interesse e deve evitar a sua modificação química (Zuo *et al.*, 2002). A obtenção de extractos enriquecidos com compostos bioactivos pode ser obtida por vários métodos de extracção utilizando diferentes tipos de solventes. Alguns estudos mostraram que o tempo de extracção e os solventes utilizados podem afectar significativamente os índices dos antioxidantes extraídos (Imram *et al.*, 2013).

Em geral, factores como o tipo de solvente, mistura aquosa de solvente, temperatura de extracção e duração da extracção, podem contribuir para a eficácia da extracção de catequinas de chá verde (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006).

Mais especificamente, noutros estudos verificou-se que o uso de solventes com polaridade diferente, nomeadamente, água, misturas aquosas de etanol, metanol e acetona são comumente usados para extrair plantas (Turkmen *et al.*, 2006; Sultana *et al.*, 2009), e têm efeitos significativos sobre o teor de polifenóis e consequentemente no seu poder antioxidante (Turkmen *et al.*, 2006). Em plantas obtêm-se geralmente maiores rendimentos de extracção, do conteúdo de fenólico e teores de actividade antioxidante quando os extractos foram obtidos utilizando solventes orgânicos aquosos, em comparação com os respectivos solventes orgânicos absolutos (Sultana *et al.*, 2009).

Ambos os chás verdes e pretos são fabricados a partir de brotos jovens, principalmente as primeiras 2-4 folhas e um botão. As outras folhas de chá (folhas de chá antigas), que não são utilizados na fabricação de chá, são considerados resíduos agrícolas (Zandi & Gordon, 1999; Farhoosh *et al.*, 2007).

Na tabela 4.1 apresentam-se os vários tipos de extracção e determinações realizados em várias pesquisas utilizando como matriz a planta do chá, a *Camellia sinensis*.

Tabela 4. 1 - Factores que influenciam a extracção dos polifenóis do chá produzido a partir da *Camellia sinensis*.

| Tipo de matriz | Solventes | Tipo de extracção | Famílias de compostos | Determinações | Referência |
|---|--|--|---|---|-------------------------------------|
| Chá verde | Tampões aquosos de 6, 7 e 8 | Filtração | Catequinas e cafeína | HPLC | Yoshida <i>et al.</i> , 1999 |
| Folhas velhas de chá (5-8) | Metanol | Aquecimento com refluxo a 80°C | Polifenóis | Grau de deteriorização do óleo de fritura | Zandi & Gordon, 1999 |
| Chá verde e chá preto | Etanol a 60%+HCl 6M | Aquecimento com refluxo a 95°C | Flavonóis | HPLC | Wang & Helliwell, 2001 |
| Chás comerciais e suplemento de chá verde | 0-90% Etanol /Metanol/ Acetona: água | Aquecimento com refluxo a 60°C | Catequinas, teoflavinas e metilxantinas | HPLC | Friedman <i>et al.</i> , 2006 |
| Chá verde | Acetona, metanol, etanol, acetonitrilo e água | Aquecimento com refluxo | Catequinas, flavonóis e proantocianidinas | HPLC e eficiências de extracção | Perva-Uzunalic <i>et al.</i> , 2006 |
| Chá preto e chá mate | Acetona, N,N-dimetilformamida (DMF), etanol, metanol e água (50%, 80%, 100 %) | Extracção com agitação horizontal | Polifenóis | Folin-Ciocalteu, DPPH [•] e tartarato ferroso | Turkmen <i>et al.</i> , 2006 |
| Folhas de chá | Metanol, água quente | Secagem das folhas com microondas; extracção à temperatura ambiente | Polifenóis | DPPH [•] , FRAP, FIC (quelação do ião ferroso) e Folin-Ciocalteu | Chan <i>et al.</i> , 2007 |
| Chá verde | Água, 80% etanol, 80% metanol e 80% acetona | Extracção com agitação à temperatura ambiente | Polifenóis | DPPH [•] , ABTS ^{•+} (actividade antioxidante por catião radical) e FIC (quelação do ião ferroso) | Druzynska <i>et al.</i> , 2007 |
| Folhas velhas e resíduos de chá preto | Clorofórmio, acetato de etilo, metanol e água quente | Extracção na autoclave (água); à temperatura ambiente (outros solventes) | Polifenóis | FRAP e FTC (método de tiocianato férrico) | Farhoosh <i>et al.</i> , 2007 |
| Chá verde e chá branco | Água destilada, água destilada com sumo de limão e soluções aquosas de etanol (10%, 40% e 70%) | Extracção à temperatura ambiente | Polifenóis Catequinas | Hidrólise do chá, polifenóis totais; flavonóides totais; concentrações individuais catequinas | Rusak <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá verde e chá preto | Solução aquosa de etanol (70%) | Extracção com refluxo seguida de partição líquido-líquido | Polifenóis | UHPLC | Scoparo <i>et al.</i> , 2012 |

Tabela 4.1 (Continuação)

| Tipo de matriz | Solventes | Tipo de extracção | Famílias de compostos | Determinações | Referência |
|-----------------------|---|--|---|--|---------------------------------|
| Chá verde | Água e acetonitrilo aquoso (50%) | Aquecimento a 80°C | Catequinas | HPLC-RP | Ito <i>et al.</i> , 2003 |
| Chá verde e chá preto | Metanol acidificado/HCl (99:1 v/v) | Extracção com agitação | Antocianinas e catequinas | HPLC-UV | Kerio <i>et al.</i> , 2012 |
| Chá verde | Água quente | Extracção a quente, a 70°C e a 75°C | Catequinas, cafeína e aminoácidos | HPLC e UHPLC | Kim <i>et al.</i> , 2009 |
| Chá preto | Água, metanol e etanol | Extracção a 60°C | Catequinas, teoflavinas e teorrubiginas | Folin-Ciocalteu, DPPH, FRAP | Imran <i>et al.</i> , 2013 |
| Chá verde | Etanol e água destilada | Ultrassons, à temperatura ambiente e extracção com refluxo | Catequinas e cafeína | HPLC | (Choung <i>et al.</i> , 2014) |
| Chá verde | Solução aquosa de etanol (50%) | Extracção com ultrassons, microondas, soxlet e por aquecimento com refluxo | Polifenóis, sacarídeos e aminoácidos | DPPH, FTC (método de tiocianato férrico) | Jun <i>et al.</i> , 2011 |
| Chá | Solução aquosa metanol (70%) e água | Extracção à temperatura ambiente | Polifenóis, catequinas, teoflavinas, teorrubiginas, glicosídeos de flavonóis e de flavonas, não flavonóides | HPLC | Lakenbrink <i>et al.</i> , 2000 |
| Brotos frescos de chá | Metanol e água Mili-Q | Extracção com agitação | Flavanóis e ácidos fenólicos | Actividade enzimática, identificação | Yao <i>et al.</i> , 2004 |
| Folhas de chá | Solução aquosa de etanol (10%) | Extracção com ultrassons | Catequinas | Factor de resposta e HPLC | Wang <i>et al.</i> , 2003 |
| Chá verde | Água fervente e soluções aquosas de etanol (15%, 30% e 60%) | Extracção à temperatura ambiente | Catequinas e ácido gálico | HPLC | Wang <i>et al.</i> , 2000 |
| Chá preto | Solução aquosa de metanol (80%) | Extracção à temperatura ambiente com agitação horizontal e no escuro | Polifenóis e metilxantinas | HPLC e DPPH | Erol <i>et al.</i> , 2010 |
| Chá verde | Água, etanol | Extracção com agitação a 300 rpm | Catequinas e cafeína | HPLC | Row & Jin, 2006 |

Tabela 4.1 (Continuação)

| Tipo de matriz | Solventes | Tipo de extracção | Famílias de compostos | Determinações | Referência |
|--|--|--|----------------------------------|--|---------------------------------|
| Folhas de chá | Metanol, solução aquosa de acetona (70%) | Soxlet | Polifenóis | Folin-Ciocalteau, FRAP, DPPH [·] , ABTS ^{·+} , Radical hidroxil, sistema de emulsão de ácido linoleico, capacidade quelante, actividade antohemolítica | Manian <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá verde, chá preto, chá oolong | Água fervente e soluções aquosas de metanol (80%) e etanol (70%) | Extracção a quente (100°C, 80°C e 60°C) com agitação | Polifenóis, catequinas e cafeína | Folin-Ciocalteau e HPLC | Khokhar & Magnusdottir, 2002 |
| Chá verde e chá preto | Água quente (70°C e 100°C) | Extracção com e sem agitação | Polifenóis | Folin-Ciocalteau, FRAP, DPPH [·] | Jayasekera <i>et al.</i> , 2011 |
| Chá preto | Acetona, DMF, etanol, metanol e soluções aquosas a 50% de acetona, DMF, etanol e metanol | Extracção com solventes | Polifenóis | Folin-Ciocalteau, DPPH [·] , FRAP, Actividade antibacteriana | Turkmen <i>et al.</i> , 2007 |
| Chá verde (solução de polifenóis (pureza>97%) extraída a partir da folha de Camellia sinensis L. foram obtidos a partir de COSIS Co., Ltd. (Chung-Nam, Coreia) | ---- | ---- | Polifenóis | Actividade antibacteriana | Cho <i>et al.</i> , 2008 |
| Chá verde (solução de polifenóis (pureza>97%) extraída a partir da folha de Camellia sinensis L. foram obtidos a partir de COSIS Co., Ltd. (Chung-Nam, Coreia) | ---- | ---- | Polifenóis | Actividade antimicrobiana | Cho <i>et al.</i> , 2010 |
| Solução Stock (10 000 mg/L) de EGCG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) | ---- | ---- | Polifenóis | Actividade antimicrobiana | Gordon & Wareham, 2010 |

Tabela 4.1 (Continuação)

| Tipo de matriz | Solventes | Tipo de extracção | Famílias de compostos | Determinações | Referência |
|--|---|---|------------------------------|--|-----------------------------|
| Polifenóis adquiridos na Zhejiang University Tea Scientific Co., Ltd (pureza ≥ 98%, Hangzhou, China) | ---- | ---- | Polifenóis | Actividade antimicrobiana | Yi <i>et al.</i> , 2010 |
| Chá verde, chá commercial e folhas frescas de chá | Água e soluções aquosas de metanol (50%, 70%) | Extracção com solventes com agitação | Polifenóis | Actividades antibacteriana e antifúngica | Archana & Abraham, 2011 |
| Chás verde e preto | Água destilada | Extracção com solvente após moagem das folhas | Polifenóis | Actividade antibacteriana | Bakkir <i>et al.</i> , 2011 |
| Soluções de EGCG (2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, e 16 mM) | ---- | ---- | Polifenóis | Actividade antibacteriana | Tran <i>et al.</i> , 2014 |

Os rendimentos de extracto das plantas e resultantes actividades antioxidantes são fortemente dependentes da natureza do solvente de extracção, devido à presença dos diferentes compostos antioxidantes de características químicas e variadas polaridades que podem ou não ser solúveis em um determinado solvente (Sultana *et al.*, 2009).

Oh e colaboradores (2013) mostraram que o extracto etanólico de chá verde apresentou a maior actividade antioxidante em todos os ensaios (determinação do conteúdo fenólico total, teor de flavonoides total, 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) - actividade de sequestração de radical, 2,2-azinobis-3-etil-benzothiazoline-6-sulfónico (ABTS) - actividade de descoloração de radical catião, FRAP - poder redutor férrico) excepto o ensaio de iões quelantes de ferro (Fe^{2+}), quando comparados com extractos de chá preto, alecrim, capim-limão, amora, folha de bambu, folha, folha de lótus, hortelã, folha de caqui e chá-mate. Os chás e folhas de caqui também exibiram um potencial antioxidante considerável, a seguir ao extracto etanólico de chá verde (Oh *et al.*, 2013).

Farhoosh e colaboradores (Farhoosh *et al.*, 2007) compararam a actividade antioxidante de extractos de várias folhas de chá velhas, de resíduos de chá preto com a actividade de extractos de chá verde. O maior rendimento de extracção e de poder antioxidante foi obtido no extracto de chá verde com água quente. No entanto, os extractos obtidos a partir das folhas de chá velhas e de resíduos de chá preto com água quente apresentaram actividades semelhantes e estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Estes últimos extractos, obtidos utilizando como solventes o acetato de etilo e métodos metanólicos, não apresentaram valores significativamente diferentes, embora os extractos de chá preto apresentem valores um pouco mais elevados. Este estudo mostra que as várias folhas de chá velhas e os resíduos de chá preto que muitas vezes são considerados como resíduos agrícolas podem ser usados como potenciais fontes naturais de antioxidantes.

Os extractos de chá verde estão a tornar-se cada vez mais importantes como ingredientes funcionais na dieta e estão a ser adicionados a uma variedade de alimentos e bebidas (Zandi & Gordon, 1999).

O uso eficiente, barato e ecologicamente correcto dos resíduos da indústria agro-alimentar é altamente eficaz em termos de custos e minimiza o impacte ambiental. Uma das opções mais eficazes é a recuperação dos constituintes bioactivos de plantas alimentares que podem ser utilizados na indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentar (Oliveira *et al.*, 2009).

Nos últimos 10 anos, farmacêuticos, químicos, nutricionistas e médicos têm trabalhado em conjunto para desenvolver novas aplicações nutricionais, para satisfazer as necessidades e pedidos dos consumidores, que estão mais conscientes sobre os produtos nutricionais que contribuem para a saúde da pele e para a prevenção de doenças (Anunciato & Rocha Filho, 2012). Entre os ingredientes utilizados, os antioxidantes são os mais importantes, sendo os mais conhecidos os carotenóides (beta-caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina e astaxantina) e polifenóis (catequinas, antocianidinas, flavonóides, taninos, e procianidinas) (Anunciato & Rocha Filho, 2012).

Como referido anteriormente, os polifenóis naturais são compostos que possuem propriedades eliminadoras de oxigénio em relação às espécies de radicais e propriedades de complexação em relação às proteínas. Estas capacidades fazem dos polifenóis compostos interessante para o tratamento de várias doenças como a inflamação ou o cancro, mas também para fins de anti-envelhecimento nas formulações cosméticas, ou para aplicações nutracêuticas. Infelizmente, estas propriedades também são responsáveis por uma falta de estabilidade a longo prazo, tornando estes compostos naturais muito sensíveis à luz e ao calor. Além disso, muitas vezes os polifenóis apresentam uma baixa biodisponibilidade principalmente devido à baixa solubilidade em água. Por último, muitas destas moléculas possuem um sabor muito amargo e adstringente, o que limita o seu uso em alimentos ou em medicamentos orais. Para contornar estes inconvenientes e para que os polifenóis possam ser consumidos oralmente, quer como alimento, quer com fins farmacêuticos ou cosméticos, têm sido desenvolvidos sistemas de encapsulamento dos polifenóis (Munin & Edwards-Lévy, 2011).

Os polifenóis podem inibir as reacções em cadeia oxidativa em pele humana e, por conseguinte, evitar certas doenças da pele e envelhecimento precoce (Zillich *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2011). Uma grande variedade de fitomoléculas, como por exemplo, a epicatequina, ácido gálico, hidroxichavicol, ácidos hidroxicinâmicos ou ácidos hidroxibenzóicos, eliminam os radicais livres das células da pele, evitando a perda de água trans-epidérmica, incluindo um factor de proteção solar (FPS) de 15, ou mais, contribuem para proteger a pele de rugas, levando a uma pele brilhante e mais jovem saudável (Mukherjee *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Zillich e colaboradores confirmaram o potencial dos polifenóis como ingredientes cosméticos activos contra o envelhecimento da pele. Foi demonstrado que os pequenos polifenóis hidrofílicos são libertados mais rapidamente e podem penetrar melhor na pele. Foi mostrado ainda que a emulsão com menor teor de lipídios apresenta taxas de libertação e permeabilidade mais elevadas para quase todos os polifenóis investigados. Verificou-se que todos os polifenóis estavam concentrados na epiderme e derme, camadas alvo para a acção designada de "anti-envelhecimento" (Zillich *et al.*, 2013).

Um estudo (Mujeeb *et al.*, 2014) mostrou que extractos de *Aegle marmelos* revelaram a presença de vários fitoquímicos biologicamente activos com a maior quantidade de metilxantinas, flavonóides e fenóis. Esses extractos mostraram uma actividade antibacteriana significativamente maior contra determinados microorganismos, nomeadamente, foi observado que o extracto aquoso apresenta uma actividade inibidora mais elevada contra *S. epidermidis*, enquanto o extracto metanólico foi mais potente contra *S. aureus* com uma concentração de 40 mg/ml. Contudo, a solução aquosa de etanol,

apresentou melhores resultados contra *E. aerogenes*, seguido por *K. pneumoniae* e *S. epidermidis* (Mujeeb *et al.*, 2014).

Os antimicrobianos derivados de plantas possuem vastas propriedades curativas já que têm menos efeitos colaterais em comparação com antimicrobianos sintéticos (Mujeeb *et al.*, 2014; Archana & Abraham, 2011), além de serem comparativamente mais baratos (Archana & Abraham, 2011). Em comparação com os produtos cosméticos sintéticos, os produtos à base de plantas são leves, biodegradáveis e com baixo perfil de toxicidade (Chanchal & Swarnlata, 2008).

Os polifenóis do chá verde ganharam assim grande popularidade para aplicação em cosméticos para a pele melhorando as propriedades dos produtos sobre os principais problemas estéticos, como envelhecimento, rugas, danos na pele causados pela radiação, a perda de brilho da pele, acne, caspa e queda de cabelo (Sandeep *et al.*, 2012). Vários estudos foram feitos com vista à aplicação das catequinas de chá verde em cosmetologia, como agente contra o envelhecimento e rugas da pele (Farris, 2007; Fisher *et al.*, 2002; Hsu, 2005; Gao *et al.*, 2008; Domingo *et al.*, 2010), como contribuintes para a fotoproteção e modulação das características da pele relacionadas com a estrutura e função do tecido (Pinnel *et al.*, 2003; Elmetts *et al.*, 2001) actuando contra a radiação UV prejudicial e ajudando a melhorar a qualidade geral da pele feminina (Heinrich *et al.*, 2011), como agente antimicrobiano evitando inflamações e infecções da pele (Song & Seong, 2007; Tran, 2013; Weber *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005; Isaacs *et al.*, 2008; Isaacs *et al.*, 2011), como agente anti-caspa tendo o chá verde um papel de esfoliante natural dos agrupamentos de células mortas no couro cabeludo sem provocar a desidratação da pele (Sueoka *et al.*, sd; Esfandiari & Kelly, 2005; Kwon *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2004).

Bakkir e colaboradores (Bakkir *et al.*, 2011) verificaram que o extracto de chá verde tem uma maior actividade antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) com uma zona de inibição de 20 mm a uma concentração de 10 g/100 ml. Para o extracto de chá preto, a zona de inibição foi de 15 mm na mesma concentração. As concentrações inibitórias mínimas para o chá verde e do chá preto foram 4mg/ml e 8mg/ml, respectivamente. Neste mesmo estudo e por inoculação subcutânea, *in vivo*, em quatro coelhos conclui-se que extractos de chá verde e preto mostraram ter uma actividade antibacteriana contra MRSA e um efeito terapêutico contra a infecção da pele causada por MRSA (Bakkir *et al.*, 2011).

Noutros estudos foram avaliados os efeitos antimicrobianos dos polifenóis dos chás sendo demonstrado que estes podem estimular diferencialmente a expressão de várias proteínas em bactérias e potenciar a actividade bactericida de oxalina para as *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (Cho *et al.*, 2008). Quando a epigallocatequina galato (EGCG) é mantida num tampão neutro, esta decompõe-se rapidamente originando teasinensina A como produto principal. A teasinensina A suprime a resistência à oxacilina do *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) (Hatano *et al.*, 2003).

Estudos mostraram efeitos inibitórios da epigallocatequina galato (EGCG) sobre fenótipos de virulência e expressão de genes regulados por *Quorum Sensing* (QS) em *Escherichia coli* O157: H7. A taxa de sobrevivência em 5 dias de nemátodes (*Caenorhabditis elegans*) que foram alimentados com o agente patogénico, sem e com EGCG é de 47,1% e 76%, respectivamente, sugerindo que a EGCG tem efeitos significativos de antipatogenicidade contra *E. coli* O157:H7 (Kang-Mu *et al.*, 2009).

Outros estudos (Tran *et al.*, 2014) mostraram também que a epigallocatequina galato (EGCG) é eficaz na inibição da produção de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* por

reguladores do deslocamento seus factores de virulência. Factores virulentos *Quorum Sensing* (QS) regulamentados, tais como a produção de piocianina, proteases e de elastase também diminuiu com o aumento da concentração de EGCG (Tran *et al.*, 2014).

A epigallocatequina-3-galato (EGCG) tem demonstrado ter efeitos antimicrobianos contra um certo número de agentes patogénicos bacterianos, nomeadamente *Stenotrophomonas maltophilia*. EGCG foi actuando lentamente como bactericida, com concentrações de quatro vezes a concentração mínima inibitória (MIC) com uma redução de 2,5 log em bactérias viáveis em 24 horas (Gordon & Wareham, 2010). Outro estudo mostrou que a acção inibitória primária dos polifenóis do chá é danificar as membranas das células bacterianas, aumenta a permeabilidade das membranas exteriores e interiores de *P. aeruginosa* e interrompe a membrana celular, com a libertação de pequenas moléculas celulares, induzindo a desordem metabólica das bactérias, o que resultou na sua morte (Yi *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Turkmen e colaboradores (Turkmen *et al.*, 2007) mostrou que o microrganismo *Staphylococcus aureus* mostrou ser sensível aos extractos de chá extraídos com água, acetona, etanol, metanol, N,N-dimetilformamida (DMF) e soluções aquosas a 50 % de acetona, etanol, metanol e DMF, com excepção para o extracto de metanólico. Ainda neste estudo, os extractos de chá não foram eficazes contra *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157: H7.

O crescimento de *E. coli* foi inibido por taninos quando estes foram expostos ao oxigénio. A autooxidação dos taninos leva à produção de peróxido de hidrogénio o que aumenta a toxicidade do meio para *E. coli* (Smith *et al.*, 2003).

Outros estudos (Cho *et al.*, 2010) avaliaram os efeitos inibitórios e a actividade antimicrobiana de microrganismos orais, nomeadamente, *Lactobacillus spp.* (*Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*), *Streptococcus spp.* (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* e *Cândida albicans*. Os resultados deste estudo mostraram a formação de biofilmes na superfície de um dente incubado apenas em solução salina, enquanto quase nenhum biofilme foi observado num dente incubado, nas mesmas condições, mas em solução de polifenóis de chá. Estes estudos sugerem que os polifenóis do chá são eficazes contra as células aderentes de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*. Assim, os polifenóis do chá apresentam um grande potencial para o uso em soluções de lavagem bucal para a prevenção e tratamento de cáries dentárias (Cho *et al.*, 2010).

Outros estudos (Zhang *et al.*, 2014) mostraram que os polifenóis do chá fortes têm efeitos inibitórios sobre a formação de biofilmes mistos de origem alimentar por *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*, além de aumentar o efeito desinfectante sobre a formação desses biofilmes mistos, fornecendo uma base científica para a aplicação de aditivos alimentares naturais para controlar a formação de biofilmes de bactérias de origem alimentar.

Outros estudos foram feitos com a finalidade de utilizar o chá verde na área alimentar.

Alguns estudos mostraram que a incorporação de extractos aquosos de chá verde em filmes de quitosano melhora as propriedades mecânicas de barreira ao vapor de água do filme e a actividade antioxidante do mesmo, verificando-se que havia um benefício desta incorporação dos extractos de chá nos filmes de quitosano e o potencial de se utilizar o filme desenvolvido como uma embalagem activa (Siripatrawan & Harte, 2010). A incorporação de extractos aquosos de chá verde em filmes de quitosano aumenta o tempo de prateleira de salsichas de porco quando estas são embrulhadas nestes filmes. Verificou-se ainda que as salsichas assim embaladas mostraram baixas alterações cor, textura,

oxidação lipídica em relação ao valor de tiobarbitúrico, crescimento microbiano e características sensoriais (Siripatrawan & Noipha, 2012).

Utilizando extractos metanólicos em óleo para fritar batatas verificou-se que a sua deteriorização é atrasada (Zandi *et al.*, 1999). Este efeito de protecção dos extractos de chá verde dos óleos vegetais, bem como as suas emulsões foi também verificado por Yin e sua equipa (Yin *et al.*, 2012).

No caso do tratamento de camarão inteiro branco com extrato etanólico de chá verde, com remoção prévia de clorofila com concentrações de 5 e 10 g/L e armazenados no gelo até 12 dias, obteve-se uma menor contagem de psicrofilos bacterianos e uma menor oxidação lipídica quando comparada com o camarão tratado com 12,5 g/L de metabisulfito de sódio (SMS). Além disso, extrato etanólico de chá verde com remoção prévia de clorofila não teve nenhum impacto adverso nas características sensoriais do camarão assim tratado (Nirmal & Benjakul, 2011).

Alguns estudos sugerem que, a nível celular (células intestinais), a associação de (-)-Epigallocatequina-3-galato (EGCG) às vitaminas E ou C aumentam a capacidade antioxidante das vitaminas contra o stress oxidativo induzido por radicais hidroxilo (Intra & Kuo, 2007).

Os antioxidantes naturais e agentes antimicrobianos podem melhorar a vida de prateleira de produtos alimentares e, devido à ausência de agentes sintéticos, estes compostos são seguros, sem quaisquer efeitos secundários na saúde humana. A actividade antimicrobiana de extractos de plantas é muitas vezes devido à fracção de óleo essencial ou de compostos contendo enxofre na fase aquosa. A composição, estrutura e grupos funcionais em óleos têm um papel importante na determinação da sua actividade antimicrobiana. Os resultados de diferentes estudos indicam que compostos bioactivos de origem vegetal, como é o caso dos polifenóis extraídos do chá (*Camellia sinensis*), podem actuar como bons substitutos de antioxidantes sintéticos e de conservantes (Sahari & Asgari, 2013).

As folhas de chá velhas são consideradas muitas vezes como resíduos agrícolas e contêm antioxidantes que podem ser extraídos e adicionados aos alimentos (Zandi *et al.*, 1999). O mesmo no que respeita às folhas cortadas nas podas e que se deixam ficar nos campos e os restos que permanecem nas fábricas após o processamento de chá (varredura e aspirados). As folhas de chá utilizadas contêm também antioxidantes que poderiam ser extraídos e utilizados, por exemplo, na indústria cosmética.

A análise qualitativa destes compostos tem tipicamente envolvido a utilização de uma variedade de cromatografia líquida de alto desempenho (sistemas HPLC), com detecção de absorvância ou de díodos, em que cada sistema está adaptado para a separação de apenas um número limitado de vários compostos fenólicos no chá (Del Rio *et al.*, 2004; Rusak *et al.*, 2008).

O uso de compostos bioactivos nos diferentes sectores comerciais, indústrias farmacêuticas, alimentares e químicas, torna necessário a procura de um método padrão mais adequado para extrair estes componentes activos das plantas. Juntamente com os métodos convencionais, numerosos novos métodos foram estabelecidos, mas até agora nenhum dos métodos é considerado como padrão para a extracção de compostos bioactivos de plantas. A eficiência dos métodos convencionais e não convencionais de extracção depende na maior parte dos parâmetros críticos de entrada: compreensão da natureza da matriz da planta e química dos compostos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013).

Neste trabalho pretendemos estudar a composição e propriedades funcionais dos extractos de chás dos Açores, bem como de resíduos produzidos na Fábrica Gorreana, nomeadamente o aspirado e a varredura, analisando as suas propriedades antioxidantes, o seu perfil de compostos fenólicos e procurando estabelecer correlações entre estes parâmetros. Os extractos analisados foram obtidos utilizando os solventes água e soluções aquosas de etanol (50%) e de acetona (50%).

Para atingir estes objectivos gerais definiram-se os seguintes objectivos específicos:

- Determinar fenólicos totais e as propriedades antioxidantes dos extractos de água, acetona a 50% e etanol a 50% utilizando como matriz os chás “Encosta da Bruma” (verde) e “Broken Leaf” (preto) e os resíduos aspirado e varredura;
- Determinação do perfil de fenólico dos extractos de água, acetona a 50% e etanol a 50% utilizando como matriz os chás “Encosta da Bruma” e “Broken Leaf” e os resíduos aspirado e varredura.
- Determinação da actividade antimicrobiana dos extractos de água, acetona a 50% e etanol a 50% utilizando como matriz os chás “Encosta da Bruma” e “Broken Leaf” e os resíduos aspirado e varredura em relação aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Candida albicans*.

4.2 - Parte Experimental

4.2.1 - Amostragem

Foram utilizados os chás, verde “Encosta de Bruma” e preto “Broken Leaf”, ambos de Gorreana (ver ponto 2.2.1). Foram ainda disponibilizados, pela fábrica do Chá Gorreana os resíduos aí obtidos, a varredura e o aspirado. As amostras analisadas foram as constantes na tabela 4.2.

Tabela 4. 2 – Identificação das amostras (chás e resíduos) estudados sob a forma de extractos.

| Amostra | Variedade | Apresentação | Composição | Código |
|-----------|--------------------|-----------------|--|--------|
| Chá Verde | “Encosta de Bruma” | Folhas | 100% chá | VA2 |
| Chá preto | “Broken Leaf” | Folhas | 100% chá | PA3 |
| Aspirado | ----- | Finamente moído | 100% resíduos <i>Camellia sinensis</i> | ---- |
| Varredura | ----- | Moído | 100% resíduos <i>Camellia sinensis</i> | ---- |

4.2.2 – Preparação dos extractos

Esta análise foi efectuada tendo como amostra as folhas secas de chá “Encosta da Bruma” e “Broken Leaf” e de resíduos secos produzidos na fábrica de chá, aspirado e varredura. Quer os chás quer os resíduos são provenientes da Fábrica de Chá Gorreana, São Miguel, Açores.

Foram utilizados três solventes: acetona (Pura, José Manuel Gomes dos Santos, Lda), etanol (96%, Panreac, Barcelona, Espanha) e água destilada.

Para se proceder à extracção dos compostos bioactivos, prepararam-se dois solventes distintos acetona:água (1:1) e etanol:água (1:1). Usou-se ainda um terceiro solvente, a água destilada.

Juntou-se num copo 1,0 g de amostra com 20,0 ml de solvente. Mantiveram-se em contacto as duas fases durante 30 minutos, no escuro, com o copo tapado. Ao fim desse tempo, filtrou-se a mistura e guardou-se a solução no frigorífico (Fagor, Carnaxide, Portugal). Ao resíduo adicionaram-se novamente 20,0 mL de solvente e colocou-se o copo tapado no escuro durante 24 horas. Ao fim desse tempo, filtrou-se novamente a mistura, adicionou-se a solução à anteriormente obtida e guardou-se no congelador (Eurofront, Uruguai, Teixeira e Ramalho, SA) a -20°C, para posterior análise.

Foi feito este procedimento duas vezes para cada amostra de chá e resíduo e com cada solvente.

4.2.3 – Determinação do rendimento e preparação de amostra para HPLC

Do extracto anteriormente obtido retiraram-se 3,0 mL e colocaram-se em balão de 100 mL previamente tarado. Em rotavapor levou-se o extracto à secura e pesou-se. Redissolveu-se o extracto seco em 3,0 mL de solução Ácido Fórmico:Acetonitrilo:Água (5:400:595). O extracto assim preparado foi injectado em HPLC.

4.2.4 – Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação dos compostos fenólicos totais foi feita pelo método Folin-Ciocalteu. Ver procedimento no ponto 2.2.7.

Para garantir que as leituras efectuadas estavam dentro da zona de linearidade do equipamento utilizado, os extractos foram diluídos de 1:50.

4.2.5 - Determinação da actividade antioxidante dos extractos

4.2.5.1 - Inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A determinação da capacidade antioxidante foi feita por inibição do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil. Ver procedimento no ponto 3.2.5.1.

Para garantir que as leituras efectuadas estavam dentro da zona de linearidade do equipamento utilizado, os extractos de etanol e de acetona foram diluídos de 1:100 e os extractos de água de 1:50.

4.2.5.2 - Actividade antioxidante de redução férrica (FRAP)

A determinação do poder antioxidante férrico redução (FRAP) foi efectuada através do procedimento descrito no ponto 3.2.5.2.

Para garantir que as leituras efectuadas estavam dentro da zona de linearidade do equipamento utilizado, os extractos foram diluídos de 1:50.

4.2.6 – Análise dos compostos fenólicos dos extractos por HPLC

Procedimento descrito no ponto 3.2.6.

4.2.6.1 – Preparação e análise das soluções padrão

Preparação descrita de acordo com o ponto 3.2.6.1.

4.2.7 - Determinação da actividade antimicrobiana dos extractos

A actividade antimicrobiana foi estudada testando a sensibilidade aos extractos das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC6538); *Escherichia coli* (ATCC8739); *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) (RN4220), e ainda da levedura *Candida albicans* (ATCC10231). Todas as estirpes foram gentilmente cedidas pela Empresa Elisa Câmara Lda à excepção do *S. aureus* (MRSA) que foi gentilmente cedido pelo Departamento de Ciências da Vida da FCT/UNL. As estirpes bacterianas utilizadas nos ensaios cresceram em meio Mueller-Hinton Broth (Biokar Diagnostics) em incubadora orbital, a 37°C e 210 rpm, tendo a densidade celular sido ajustada a 1×10^8 UFC/mL com meio Mueller-Hinton Broth antes do início do ensaio. No caso da levedura o crescimento foi efectuado a 30°C tendo a densidade celular sido ajustada a 1×10^7 UFC/mL. Em placas de Petri contendo 20 mL de agar Mueller-Hinton, espalhou-se uniformemente 100 µL de cada cultura. Em seguida, efectuaram-se poços equidistantes de 6 mm de diâmetro com o auxílio de um tubo de vidro estéril. Em cada um desses poços colocaram-se 50 µL de cada um dos extractos ou 50 µL do respectivo solvente (controlo negativo). As placas foram depois colocadas durante 30 minutos a 4°C para difusão completa dos extractos e, em seguida, foram a incubar em estufa a 37 °C durante 24 horas, no caso das bactérias, ou em estufa a 30°C durante 48 horas, no caso da levedura. A actividade antimicrobiana foi estimada a partir do diâmetro dos halos de inibição obtidos.

4.2.8 – Tratamento estatístico

Tratamento efectuado de acordo com os procedimentos descritos em 3.2.7.

4.3 – Resultados

Foram testados cinco solventes: água, etanol, acetona e soluções aquosas de etanol e de acetona (50%). Verificou-se que os extractos de solventes a 50% continham quantidades mais elevadas de polifenóis, em comparação com os seus correspondentes puros, depois de 24 h de extracção. Assim, para prosseguimento deste estudo, optou-se utilizar apenas a água e as soluções aquosas de etanol e de acetona (50%) como solventes utilizados.

4.3.1 – Determinação do rendimento de extracção

O rendimento de extracção foi avaliado para cada chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e resíduo de chá (Aspirado e Varredura) para cada um dos solventes utilizados (água e soluções aquosas a 50% de acetona e etanol). Foram calculadas as médias individuais para cada amostra bem como as médias dos rendimentos para cada solvente utilizado e para cada combinação de amostra/solvente.

O maior rendimento de extracção verificou-se para o extracto obtido a partir do resíduo aspirado extraído com o solvente água (47,53%) enquanto o menor rendimento foi observado para o extracto obtido pela extracção do chá “Broken Leaf” com acetona a 50% (figura 4.1).

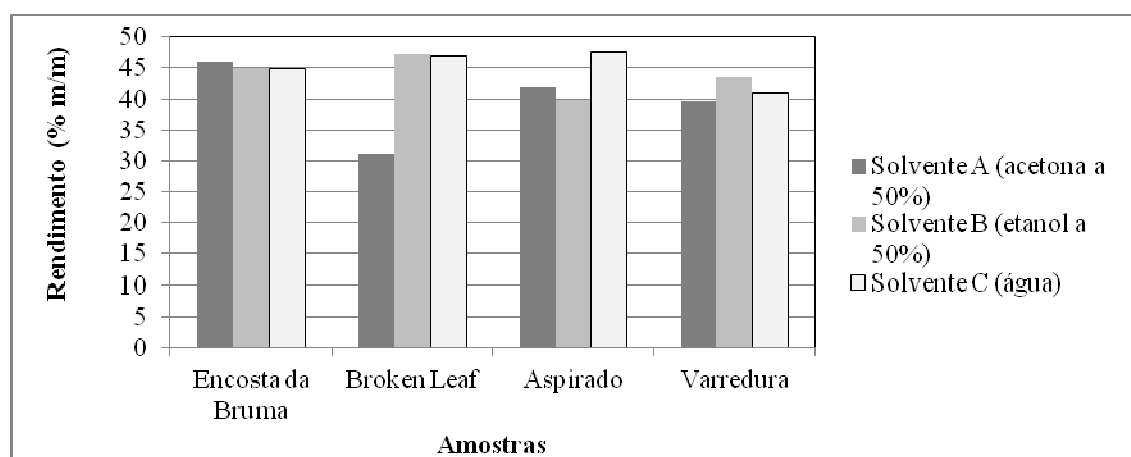


Figura 4. 1 - Rendimento de extracção de extractos obtidos com amostras de chá (“Encosta da Bruma” e Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura).

Não se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$), nas médias dos rendimentos registados para cada amostra (para o conjunto dos três solventes utilizados). Este resultado indica que os dois resíduos (aspirado e varredura) têm provavelmente contributos equivalentes dos chás verdes e dos chás pretos e que os próprios chás podem diferir no tipo de compostos extraídos mas não no rendimento mássico de extracção.

Quando se considera a média dos rendimentos de extracção obtidos com cada um dos solventes para o conjunto das amostras testadas verifica-se que o solvente A (50% acetona aquosa) apresenta um rendimento significativamente inferior aos outros dois solventes testados. O rendimento de extracção obtido com o solvente C (100% água) é mais elevado que o rendimento obtido com o solvente B (50% etanol aquoso) mas não apresentam diferenças com significado estatístico.

A presença de água afecta de forma determinante o rendimento de extracção pois quando se testou a extracção destes chás e resíduos utilizando apenas acetona e etanol obtiveram-se extractos

significativamente mais diluídos, nos quais se verificou posteriormente que apresentavam actividade antioxidante residual pelo que não foram incluídos neste estudo.

Quando se analisam as médias de rendimento de cada combinação amostra/solvente verifica-se que de uma forma geral as amostras dos chás apresentaram valores mais elevados que as amostras de resíduos sendo em alguns casos significativamente superiores (tabela 4.3). Por exemplo, os rendimentos de extracção das folhas de chá preto “Broken Leaf” com os solventes B e C foram significativamente superiores aos rendimentos de extracção dos dois resíduos com todos os solventes excepto o resíduo de aspiração com o solvente C (água).

Tabela 4. 3 - Médias dos rendimentos de extracção obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) para diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol).

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| “Encosta da Bruma” | 45,94 ^{ef} | 44,95 ^{def} | 44,87 ^{def} |
| “Broken Leaf” | 31,22 ^a | 47,33 ^f | 46,99 ^f |
| Aspirado | 41,86 ^{bcd} | 39,80 ^b | 47,53 ^f |
| Varredura | 39,55 ^b | 43,52 ^{cde} | 40,95 ^{bc} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey

Esta observação pode indicar a presença de componentes inorgânicos (pós, fibras, etc.) presentes nos resíduos aspirados e varridos, contribuindo para a sua massa mas não contendo compostos extractáveis nestas condições.

Um estudo (Perva-Uzunalic *et al.*, 2006) mostrou uma eficiência de extracção do conteúdo do chá verde que dependia do solvente utilizado. Assim, utilizando como solventes água e os solventes aquosos de acetona (50%) e de etanol (50%) este estudo obteve rendimentos de extracção de 29,2%, de 33,5% e de 32,8%, respectivamente. Estes rendimentos são inferiores aos rendimentos aqui obtidos, devido ao tempo de extracção que foi de apenas 2 horas; no entanto para o mesmo tempo de extracção a maior eficiência verifica-se no extracto de acetona (50%), seguida do extracto de etanol (50%) e por fim da água.

4.3.2 - Actividade biológica de extractos de chás verde e preto e de dois resíduos da fábrica de chá (Gorreana)

Os extractos, preparados a partir do chá “Encosta da Bruma” (verde), do chá “Broken Leaf” (preto) e dos resíduos Aspirado e Varredura, utilizando os solventes acetona (50%), etanol (50%) e água, foram analisados quanto às suas propriedades biológicas, nomeadamente, a determinação dos fenólicos totais (teste de Folin-Ciocalteu), actividade antiradicalar (DPPH) e poder redutor (FRAP).

Os extractos foram preparados a partir de matrizes que apresentavam granulometria diversa (os chás apresentam-se em folha solta, a varredura apresenta-se em pequenas partículas e o aspirado finamente moído). Conforme foi referido anteriormente (Rusak *et al.*, 2008; Komes *et al.*, 2010; Samaniego-Sanchez *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012), a granulometria influencia o teor de fenólicos extraídos, no entanto optou-se por utilizar as matrizes, com a granulometria apresentada pela fábrica da Gorreana, que correspondem ao tamanho que é obtido normalmente na laboração.

4.3.2.1 – Fenólicos totais

O maior valor de fenólicos totais foi determinado no extracto obtido a partir do resíduo aspirado, extraído com a solução aquosa de acetona (50%), com um valor de 232,1 mg/g de extracto seco, enquanto que o menor valor determinado foi de 49,9 mg/g de extracto seco foi observado para o extracto obtido pela extracção do chá “Broken Leaf” com água (figura 4.2).

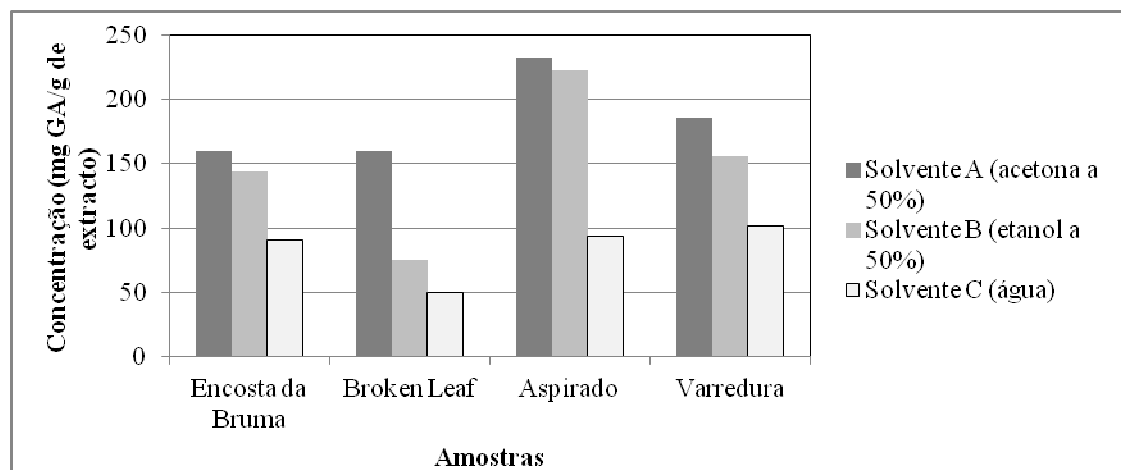


Figura 4. 2 - Teor de fenólicos totais de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura).

O chá verde contém entre 30 e 40 % de polifenóis extraíveis com água, enquanto o chá preto contém entre 3 e 10 % (Archana & Abraham, 2011).

Os extractos de acetona apresentaram valores de fenólicos totais significativamente superiores aos apresentados pelos extractos de água para todos as amostras testadas (tabela 4.4).

No caso do etanol, o extracto de “Broken Leaf” apresenta um teor de fenólicos significativamente inferior a todos os outros extractos etanólicos, o que poderá resultar de dois factores conjugados: o etanol a 50% parece ser um solvente menos eficiente na extracção das catequinas do que a acetona a 50%, seja qual for a amostra; por outro lado o chá “Broken Leaf” apresenta menor teor de compostos fenólicos quando comparado com as outras amostras, seja qual for o solvente (Tabela 4.4).

Tabela 4. 4 - Médias dos teores de fenólicos totais de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) com diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol), expressos em mg/g de extracto seco.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| “Encosta da Bruma” | 160,0 ^d | 144,3 ^d | 90,9 ^b |
| “Broken Leaf” | 159,5 ^d | 75,4 ^b | 49,9 ^a |
| Aspirado | 232,1 ^f | 222,7 ^f | 93,7 ^c |
| Varredura | 185,3 ^e | 155,9 ^d | 101,4 ^c |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey

As duas combinações com maior teor de fenólicos ($p < 0,05$) foram os extractos de Aspirado com etanol a 50% e com acetona a 50%; este resultado parece indicar que a muito baixa granulometria do aspirado afecta de forma muito significativa a eficiência de extracção.

Num estudo (Turkmen *et al.*, 2006) obtiveram-se teores de fenólicos totais para os extractos obtidos a partir de chá preto utilizando como solvente as soluções aquosas de acetona (50%) e de etanol (50%) de $92,4 \pm 0,83$ e de $74,0 \pm 0,94$ mg/g de extracto seco, respectivamente. Estes teores foram inferiores aos obtidos neste estudo o que poderá ser devido à preparação dos extractos. Na investigação de Turkmen os extractos foram preparados colocando 0,2 g da amostra em 2 mL e extraíndo durante 1 hora com agitação horizontal, depois o obtido resíduo é reextraído duas vezes durante 2 horas e depois mais duas vezes extraído com 3 horas. Os extractos assim obtidos são misturados. Verifica-se no entanto que a solução aquosa de acetona (50%) apresenta o teor de fenólicos totais superior à solução aquosa de etanol (50%), idêntico com este estudo.

Outro estudo (Druzynska *et al.*, 2007), apesar de ser realizado utilizando as soluções aquosas de acetona (80%) e de etanol (80%) e com tempos de extracção de 15 min, 30 min e 60 min a partir de chá verde, mostra, à semelhança do que se observa no chá preto, que a maior eficiência de extracção se verifica com a acetona (80%) e consequentemente apresenta neste solvente maiores teores de fenólicos totais.

A concentração de compostos fenólicos totais expressa em mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco, avaliada pela reacção de Folin-Ciocalteu, apresentou uma média significativamente inferior para a água relativamente às soluções aquosas dos dois solventes orgânicos.

Este resultado está de acordo com inúmeras referências bibliográficas que referem as soluções aquosas de álcoois como solventes com grande capacidade de extracção deste tipo de compostos (Druzynska *et al.*, 2007; Akowuah *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2004; Nepote *et al.*, 2005).

Comparando as médias dos compostos fenólicos obtidos, com os diferentes solventes para a mesma amostra, verifica-se que o aspirado e a varredura apresentam valores mais elevados que os apresentados pelos chás testados, evidenciando a influência da granulometria da amostra neste parâmetro, sendo o teor de fenólicos do Aspirado significativamente superior ao do “Broken Leaf”.

4.3.2.2 - Actividade antioxidante

A quantificação da capacidade antioxidante dos extractos, à semelhança do que foi realizado nas infusões, foi efectuada através da utilização de dois métodos distintos: pela eliminação/sequestração dos radicais de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e pela determinação da capacidade de redução de ferro (FRAP).

4.3.2.2.1 - Antiradicalar (DPPH)

Em relação à capacidade antioxidante verificou-se que o extracto que apresentava maior actividade antradicalar, com um teor de 198,2 mg/g de extracto seco, foi o extracto obtido a partir do resíduo aspirado extraído com a solução aquosa de acetona (50%). O que apresentou menos actividade, com um teor de 37,9 mg/g de extracto seco foi observado o extracto obtido pela extracção do chá “Broken Leaf” com água (figura 4.3).

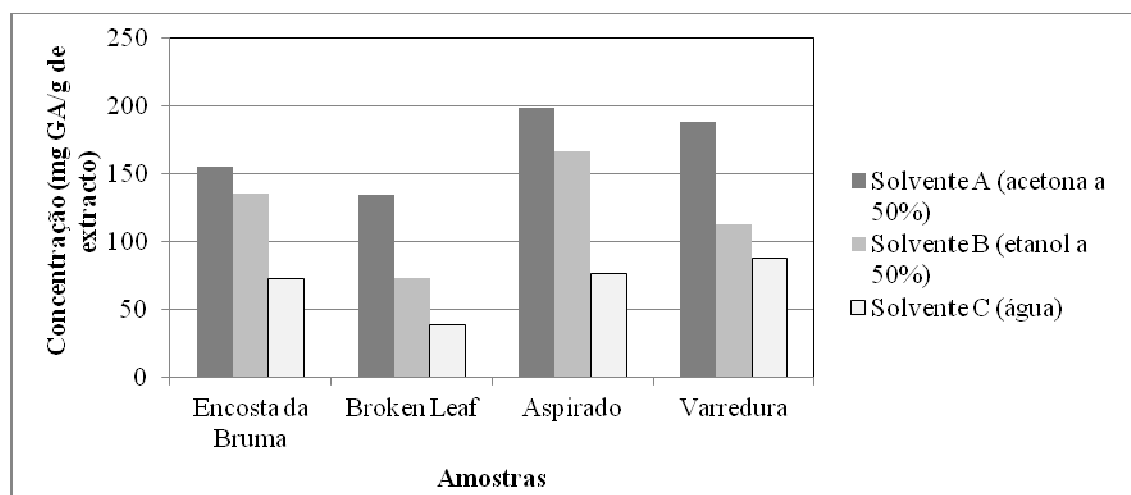


Figura 4. 3 - Actividade antiradicalar (DPPH•) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura).

Tal como no caso do teor de fenólicos por Folin-Ciocalteu verifica-se que os extractos de água apresentam as actividades antiradicalares mais baixas, para todas as amostras e todos os solventes, excepto a combinação “Broken-Leaf” com etanol a 50% (Tabela 4.5).

Por outro lado, os extractos dos resíduos Aspirado e Varredura com acetona a 50% evidenciaram actividade antioxidante superior a todos os extractos de chás “Broken Leaf” ou “Encosta da Bruma”, para qualquer dos solventes testados.

Já os extractos etanólicos apresentaram valores mais próximos dos extractos de acetona do que no caso dos correspondentes teores de compostos fenólicos.

Assim, verifica-se que os compostos fenólicos das amostras devem certamente contribuir para a sua actividade anti-radicalar mas outros componentes não fenólicos poderão também influenciar esta propriedade.

Tabela 4. 5 - Médias da actividade antiradicalar (DPPH•) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) com diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol), expressos em mg/g de extracto seco.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| “Encosta da Bruma” | 154,7 ^{de} | 135,0 ^d | 72,8 ^b |
| “Broken Leaf” | 134,4 ^{cd} | 73,2 ^b | 37,9 ^a |
| Aspirado | 198,2 ^g | 166,3 ^{ef} | 75,7 ^b |
| Varredura | 187,8 ^{fg} | 112,3 ^c | 87,9 ^b |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey

Esta diferença reflecte-se nas médias da actividade antiradicalar dos extractos obtidos com os três solventes que foram todas significativamente diferentes sendo inferior para a água e superior para a acetona ($p < 0,05$).

Um estudo (Turkmen *et al.*, 2006) indica valores de actividade antiradicalar de $83,1 \pm 0,22$ e de $68,7 \pm 1,93$ expressos em mg/g de extracto seco, para extractos de chá preto utilizando solução aquosa de acetona (50%) e solução aquosa de etanol (50%), respectivamente. Este estudo indica teores superiores de actividade antiradicalar para o extracto de acetona (50%). Druzynska e colaboradores (Druzynska *et al.*, 2007) apesar de utilizar extractos preparados a partir de chá verde com solventes aquosos de acetona e de etanol (80%) e tempos de extracção de 60 minutos, no máximo, verificam que

a maior actividade antiradicalar é determinada no extracto de acetona (80%), seguida da actividade determinada na solução de etanol (80%) e por fim no extracto aquoso.

4.3.2.2.2 - Redutora férrica (FRAP)

No que diz respeito ao poder redor férrico, verificou-se que o extracto que apresentava maior valor, com um teor de 145,2 mg/g de extracto seco, foi o extracto obtido a partir do resíduo aspirado extraído com a solução aquosa de acetona (50%). O extracto que apresentou um menor poder redutor foi o extracto obtido pela extracção do chá “Broken Leaf” com água, com um teor de 25,4 mg/g de extracto seco foi observado (figura 4.4).

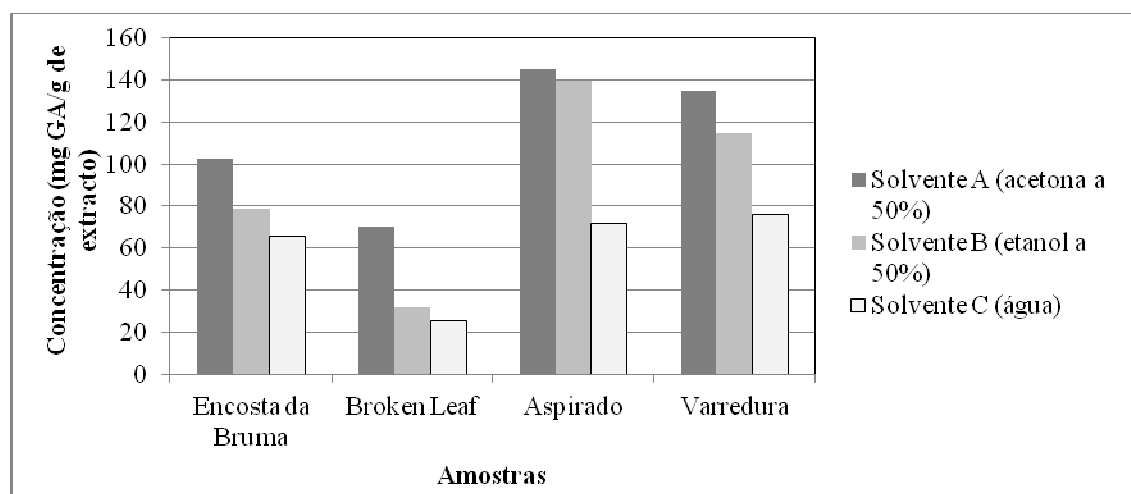


Figura 4. 4 - Poder redutor férrico (FRAP) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura).

Tal como verificado anteriormente, a água foi o solvente que produziu extractos com menor actividades redutora fosse qual fosse a amostra enquanto o oposto se verificou para as amostras Varredura e Aspirado que apresentaram valores mais elevados que as restantes amostras fosse qual fosse o solvente utilizado (tabela 4.6). Os extractos de solventes orgânicos dos resíduos apresentaram actividade redutora significativamente superior a todos os outros excepto o extracto de Encosta da Bruma com acetona.

Tabela 4. 6 - Médias do poder redutor férrico (FRAP) de extractos obtidos para amostras de chá (“Encosta da Bruma” e “Broken Leaf”) e de resíduos (aspirado e varredura) com diferentes solventes (água e soluções aquosas de acetona e de etanol), expressos em mg/g de extracto seco.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| “Encosta da Bruma” | 102,3 ^{cd} | 78,6 ^{bc} | 65,7 ^b |
| “Broken Leaf” | 70,0 ^b | 31,6 ^a | 25,4 ^a |
| Aspirado | 145,2 ^e | 139,4 ^e | 72,1 ^{bc} |
| Varredura | 134,6 ^e | 114,4 ^{de} | 76,0 ^{bc} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey

Considerando as médias para as diferentes amostras testadas, a água apresentou a actividade redutora mais baixa sendo significativamente inferior à dos extractos com acetona (50%).

Comparando as médias para cada amostra (vários solventes) os valores mais baixos foram obtidos para o chá “Broken-Leaf”, sendo significativamente inferiores aos extractos de resíduos (Aspirado e Varredura).

Os resultados deste estudo mostram que as variações no teor de polifenóis de vários extractos variaram muito, dependendo do tipo de solvente utilizado e consequentemente das suas polaridades. Mostrou ainda que os solventes aquosos foram mais eficientes na extracção de fenólicos totais, em comparação com seus correspondentes absolutos. Observações similares foram relatadas em estudos anteriores (Akowuah *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2004). No estudo realizado por Wang e colaboradores (Wang *et al.*, 2004), várias concentrações de etanol variando de 15% a 96% foram investigados para a extracção de compostos fenólicos, nomeadamente, os ácidos rosmarínico e cafeico de algumas ervas. As concentrações de etanol entre 30% e 60% apresentaram os maiores rendimentos de extracção de ambos os compostos. Este resultado está de acordo com Nepote e colaboradores (Nepote *et al.*, 2005) que relataram que soluções aquosas de etanol (50%) apresentam teores máximos de fenólicos totais extraídos de pele de amendoim quando testados extractos cujas concentrações de etanol do solvente variam entre 30% e 96%. De acordo com outro estudo (Chavan *et al.*, 2001), os extractos de acetona aquosa de diferentes ervilhas tinham conteúdos de polifenóis totais mais elevados do que os de acetona.

Verificou-se existir uma correlação muito forte e significativa ($0,9 < |r| < 1,0$) entre o teor de compostos fenólicos totais avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu, a actividade antiradicalar avaliada pela reacção com o DPPH e a actividade redutora avaliada por FRAP, o que confirma o importante contributo dos compostos fenólicos dos chás para a sua actividade antioxidante, quer redutora quer antiradicalar (tabela 4.7).

Tabela 4. 7 - Correlações de Pearson entre o rendimento de extracção e as propriedades antioxidantes para os extractos analisados.

| Correlações de Pearson | Rendimento | Folin-Ciocalteu | DPPH | FRAP |
|------------------------|------------|-----------------|--------|---------|
| Rendimento | 1 | -0,516 | -0,477 | -0,345 |
| Folin-Ciocalteu | -- | 1 | 0,954* | 0,922* |
| DPPH | -- | -- | 1 | 0,883** |
| FRAP | -- | -- | -- | 1 |

*A correlação é significativa no nível 0,01. **A correlação é significativa no nível 0,05.

Observa-se também uma correlação forte entre a actividade antiradicalar e a actividade redutora o que indica que os compostos antioxidantes do chá apresentam estas duas propriedades funcionais.

4.3.3 – Determinação de compostos fenólicos individuais em extractos aquosos de chá verde e preto

4.3.3.1 – Avaliação de compostos fenólicos através do perfil de HPLC-DAD

Os somatórios das áreas cromatográficas a cada um dos comprimentos de onda seleccionados (280 nm, 320 nm e 360 nm) reflectem a abundância de compostos que absorvem especificamente a esse comprimento de onda: catequinas, procianidinas, teoflavinas e ácidos hidroxibenzóicos a 280 nm, ácidos hidroxicinâmicos, flavonas glicosiladas e flavonóis glicosilados acilados a 320 nm e flavonóis, flavonas, flavonóis glicosilados a 360 nm (Lin *et al.*, 2008; Sakakibara *et al.*, 2003).

Os extractos de água das diversas amostras apresentaram médias do somatório das áreas cromatográficas significativamente inferiores às médias dos mesmos somatórios para os extractos de acetona e de etanol excepto no caso dos somatórios a 280 nm para os quais esta diferença só se observa para os extractos de acetona (tabela 4.8).

Tabela 4. 8 - Áreas cromatográficas para cada um dos comprimentos de onda seleccionados (280 nm, 320 nm e 360 nm) em função do solvente utilizado.

| Somatórios/Solventes | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Somatórios 280 nm | 459240312,8 ^b | 411571398,6 ^{ab} | 277349645,6 ^a |
| Somatórios 320 nm | 142771675,1 ^b | 141599862,3 ^b | 88455262,9 ^a |
| Somatórios 360 nm | 102718622,9 ^b | 108181765,4 ^b | 63281731,5 ^a |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey. Determinação feita individualmente para cada tipo de somatório.

Quando se consideram as várias combinações amostra/solvente verifica-se que os valores mais baixos do somatório das áreas cromatográficas a 280 nm foram obtidos para os extractos de água ou para os extractos de “Broken Leaf” com diversos solventes; por outro lado os extractos de acetona com as restantes amostras e os extractos dos resíduos (Aspirado e Varredura) apresentam valores mais elevados deste somatório (tabela 4.9).

O mesmo comportamento foi evidenciado pelos somatórios das áreas cromatográficas a 320 nm e a 360 nm.

Tabela 4. 9 - Áreas cromatográficas para cada um dos comprimentos de onda seleccionados (280 nm, 320 nm e 360 nm) em função do extracto (amostra/solvente).

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Somatório a 280 nm | | | |
| “Encosta da Bruma” | 487092829,6 ^d | 461626010,6 ^{cd} | 252658792,9 ^a |
| “Broken Leaf” | 246610052,3 ^a | 261243344,2 ^a | 221962422,0 ^a |
| Aspirado | 637105157,3 ^e | 510630700,6 ^{de} | 325083223,3 ^{abc} |
| Varredura | 466153212,2 ^d | 412785539,2 ^{bcd} | 309694144,4 ^{ab} |
| Somatório a 320 nm | | | |
| “Encosta da Bruma” | 162837628,5 ^{cd} | 153951297,6 ^{bcd} | 94819571,9 ^{ab} |
| “Broken Leaf” | 99631707,7 ^{ab} | 103217469,3 ^{abc} | 72176032,1 ^a |
| Aspirado | 153799374,2 ^{bcd} | 189486580,7 ^d | 95864530,1 ^{ab} |
| Varredura | 154817990,2 ^{bcd} | 119744101,8 ^{abc} | 90960917,6 ^a |

Tabela 4.9 (Continuação)

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Somatório a 360 nm | | | |
| “Encosta da Bruma” | 126231418,1 ^{cd} | 100294661,8 ^{bcd} | 72152895,2 ^{ab} |
| “Broken Leaf” | 69617155,2 ^{ab} | 93262038,5 ^{bc} | 50271684,1 ^a |
| Aspirado | 100949351,3 ^{bcd} | 138024742,7 ^d | 65093533,5 ^{ab} |
| Varredura | 114076567,2 ^{cd} | 101145618,6 ^{bcd} | 65608812,9 ^{ab} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey. Comparação feita separadamente para cada tipo de somatório.

Os somatórios das áreas cromatográficas a 280 nm, 320 nm e 360 nm apresentaram correlações fortes com a actividade antioxidante avaliada pela reacção de Folin-Ciocalteu, pela reacção de redução férrica (FRAP) e com a actividade antiradicalar avaliada pela reacção com o DPPH.

Todas estas correlações foram significativas no nível 0,01 e os coeficientes de correlação de Pearson são mais elevados para os somatórios a 280 nm seguidos dos coeficientes para os somatórios a 320 nm e finalmente os coeficientes dos somatórios a 360 nm. Estas diferenças reflectem a abundância de componentes (tanto em número como em concentração) que foram detectados a cada comprimento de onda (tabela 4.10).

Tabela 4. 10 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes dos extractos analisados e os somatórios a 280nm, 320 nm e 360 nm.

| Correlações de Pearson | Somatório 280nm | Somatório 320nm | Somatório 360nm |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Folin-Ciocalteu | 0,850* | 0,810* | 0,723* |
| DPPH | 0,851* | 0,826* | 0,727* |
| FRAP | 0,853* | 0,760* | 0,676* |

*A correlação é significativa no nível 0,01.

Estes resultados indicam que os compostos determinados por HPLC têm um contributo importante para a actividade antioxidante determinada nos vários extractos pelo que se decidiu analisar quais os principais componentes destes extractos quer a nível de grupo funcional quer a nível de compostos individuais e avaliar a correlação das suas concentrações com a actividade antioxidante dos extractos.

4.3.3.2 – Identificação de famílias de compostos fenólicos no perfil de HPLC-DAD

A Figura 4.5 ilustra o perfil cromatográfico em HPLC para 280 nm, 320 nm e 360 nm do extracto obtido por extracção do resíduo aspirado com solução aquosa de acetona (50%), onde são identificados os compostos correspondentes a cada uma das famílias consideradas.

Os compostos individuais detectados na análise cromatográfica foram identificados por comparação do tempo de retenção e do espectro de UV-VIS com os correspondentes padrões e com resultados da literatura para matrizes idênticas (Lin *et al.*, 2008; Sakakibara *et al.*, 2003). Seleccionaram-se para efeitos de quantificação os picos cromatográficos com maior área, e aqueles para os quais se dispunha de padrões, tendo-se utilizado o comprimento de onda ao qual cada composto apresentava maior área cromatográfica.

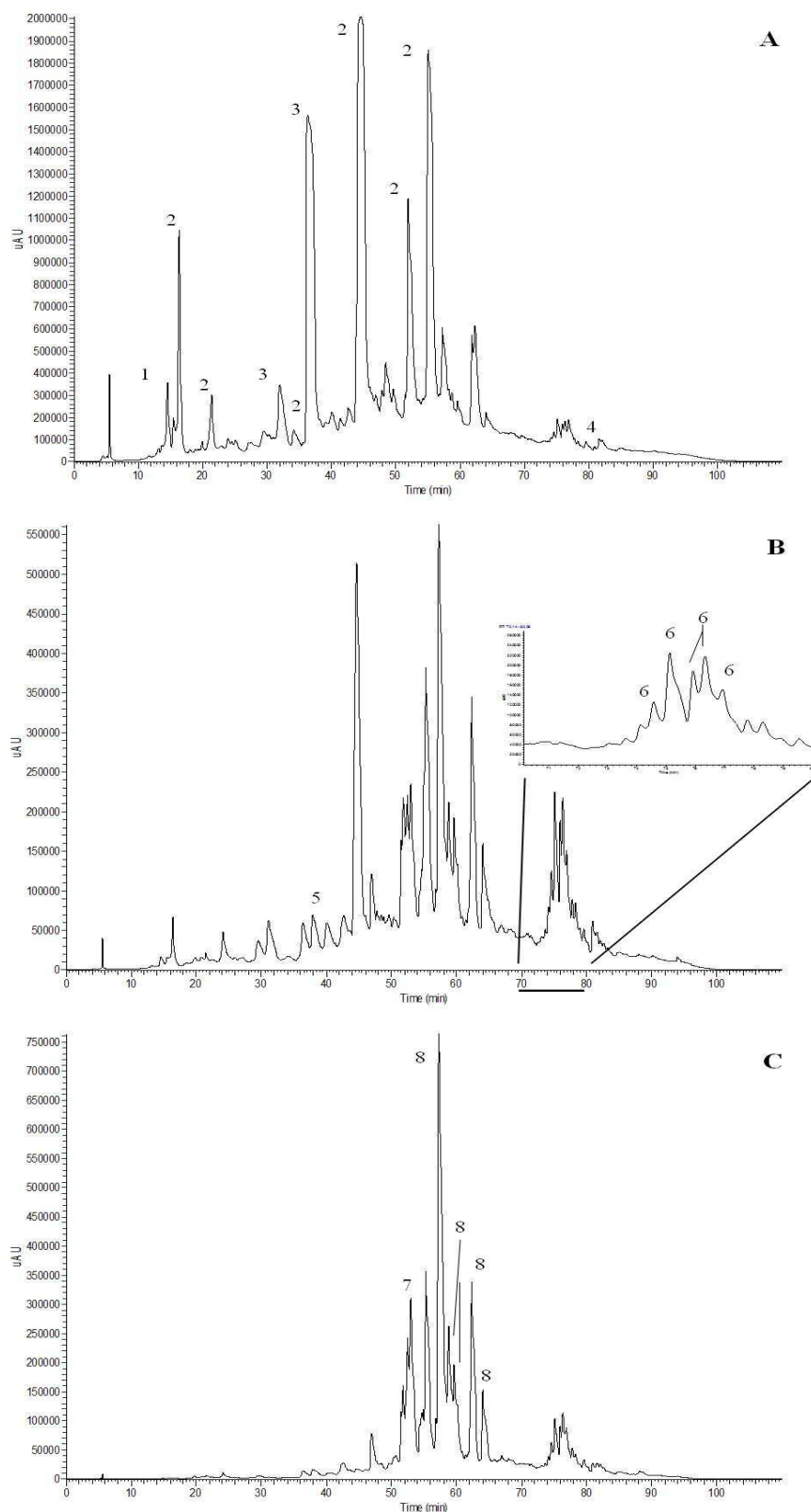


Figura 4. 5 – Cromatograma de HPLC do extracto de resíduo aspirado com acetona (50%) a 280 nm (A), a 320 nm (B) e a 360 nm (C). Picos correspondentes a famílias de compostos são: 1 – Ácidos hidroxibenzóicos; 2 – Catequinas; 3 – Metilxantinas; 4 – Teoflavinas; 5 – Ácidos hidroxicinâmicos; 6 – Flavonóis glicosilados acilados; 7 – Flavonóis; 8 - Flavonóis glicosilados.

Os compostos assim determinados foram agrupados em famílias com o mesmo grupo funcional sendo a concentração de cada família expressa em equivalentes do seu componente mais abundante em unidades de mg/g extracto seco.

Quando se compararam estas concentrações para as diferentes combinações amostra-solvente verificou-se que a água apresentou maior capacidade de extracção dos ácidos hidroxibenzóicos (tabela 4.11).

Tabela 4. 11 - Concentração de cada família de compostos, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Ácidos hidroxibenzóicos | | | |
| “Encosta da Bruma” | 4,300 ^{ab} | 4,510 ^{ab} | 7,155 ^{bcd} |
| “Broken Leaf” | 6,375 ^{abcd} | 3,845 ^a | 8,130 ^{cd} |
| Aspirado | 6,295 ^{abc} | 7,850 ^{cd} | 9,410 ^d |
| Varredura | 6,495 ^{a bcd} | 5,750 ^{abc} | 20,690 ^e |
| Catequinas | | | |
| “Encosta da Bruma” | 99,730 ^d | 96,840 ^d | 41,880 ^{ab} |
| “Broken Leaf” | 38,980 ^{ab} | 25,985 ^a | 19,130 ^a |
| Aspirado | 147,640 ^e | 110,860 ^d | 61,640 ^{bc} |
| Varredura | 109,420 ^d | 80,865 ^{cd} | 47,195 ^{abc} |
| Metilxantinas | | | |
| “Encosta da Bruma” | 29,440 ^{bcd} | 30,735 ^{cd} | 24,760 ^{abc} |
| “Broken Leaf” | 40,140 ^e | 26,745 ^{bc} | 23,640 ^{ab} |
| Aspirado | 33,570 ^d | 30,890 ^{cd} | 20,040 ^a |
| Varredura | 33,565 ^d | 27,885 ^{bcd} | 28,505 ^{bcd} |
| Ácidos hidroxicinâmicos | | | |
| “Encosta da Bruma” | 0,895 ^{bcd e} | 0,775 ^{abcd} | 0,610 ^{abc} |
| “Broken Leaf” | 1,315 ^f | 0,955 ^{cdef} | 0,520 ^a |
| Aspirado | 1,245 ^{ef} | 1,265 ^{ef} | 0,540 ^{ab} |
| Varredura | 1,125 ^{def} | 0,885 ^{abcd} | 0,630 ^{abc} |
| Flavonóis Glicosilados Acilados | | | |
| “Encosta da Bruma” | 3,750 ^{abc} | 3,390 ^{ab} | 2,380 ^a |
| “Broken Leaf” | 5,835 ^{bcd} | 3,925 ^{abc} | 2,050 ^a |
| Aspirado | 6,370 ^{cd} | 8,045 ^d | 3,135 ^{ab} |
| Varredura | 5,685 ^{bcd} | 4,535 ^{abc} | 3,430 ^{ab} |
| Flavonóis Glicosilados | | | |
| “Encosta da Bruma” | 12,185 ^{abcde} | 15,240 ^{de} | 6,900 ^{abc} |
| “Broken Leaf” | 9,380 ^{abcd} | 12,835 ^{bcd e} | 4,990 ^a |
| Aspirado | 7,495 ^{abcd} | 19,005 ^e | 4,770 ^a |
| Varredura | 9,770 ^{abcd} | 13,285 ^{cde} | 5,315 ^{ab} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey. Comparação feita separadamente para cada tipo de família de compostos.

No caso das catequinas, das metilxantinas, dos ácidos hidroxicinâmicos e dos flavonóis glicosilados acilados obtiveram-se valores mais elevados nos extractos de acetona e no extracto etanólico do aspirado.

Obtiveram-se concentrações de catequinas superiores a 80 mg/g para todos os extractos de acetona e etanol excepto para o chá preto “Broken Leaf”. Por outro lado os extractos deste chá e particularmente os obtidos com acetona apresentaram concentrações elevadas de metilxantinas, ácidos hidroxicinâmicos, e flavonóis glicosilados acilados.

Estas três famílias de compostos foram eficientemente extraídas pela acetona a 50% nas várias amostras apresentando também concentrações elevadas em alguns extractos de etanol a 50% nomeadamente nos extractos etanólicos do resíduo Aspirado.

Os flavonóis glicosilados foram a família de compostos fenólicos, preferencialmente extraídos com o etanol a 50%, apresentando concentrações mais elevadas nestes extractos para qualquer das amostras testadas.

Testaram-se as correlações lineares entre a concentração de cada família de compostos fenólicos presentes nos extractos e a sua actividade antioxidante, através da determinação do coeficiente de correlação de Pearson (tabela 4.12).

Tabela 4. 12 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes dos extractos analisados e as famílias detectadas por HPLC.

| Correlações de Pearson | Folin-Ciocalteu | DPPH | FRAP |
|--|------------------------|-------------|-------------|
| Ácidos hidroxibenzóicos | -0,228 | -0,267 | -0,085 |
| Catequinas | 0,881* | 0,886* | 0,894* |
| Metilxantinas | 0,670* | 0,708* | 0,436** |
| Ácidos hidroxicinâmicos | 0,795* | 0,770* | 0,568* |
| Flavonóis glicosilados acilados | 0,846* | 0,758* | 0,705* |
| Flavonóis glicosilados | 0,488** | 0,428** | 0,346 |

*A correlação é significativa no nível 0,01. **A correlação é significativa no nível 0,05.

Encontraram-se correlações fortes entre o teor de compostos fenólicos totais avaliado pela reacção de Folin-Ciocalteu e os teores de catequinas, metilxantinas, ácidos hidroxicinâmicos e flavonóis glicosilados acilados sendo os coeficientes de correlação para as catequinas e para os flavonóis glicosilados acilados superiores a 0,8.

A actividade antiradicalar relativa ao DPPH apresenta correlações fortes com as mesmas famílias de compostos mas apenas as catequinas têm um coeficiente de correlação superior a 0,8.

Relativamente à actividade redutora férrica (FRAP) observam-se correlações fortes com os teores de catequinas, flavonóis glicosilados acilados sendo mais uma vez as catequinas que apresentaram um coeficiente de correlação superior a 0,8.

4.3.3.3 – Quantificação de compostos fenólicos individuais no perfil de HPLC-DAD

A Figura 4.6 ilustra o perfil cromatográfico em HPLC para 280 nm, 320 nm e 360 nm do extracto obtido por extracção do resíduo aspirado com solução aquosa de acetona (50%).

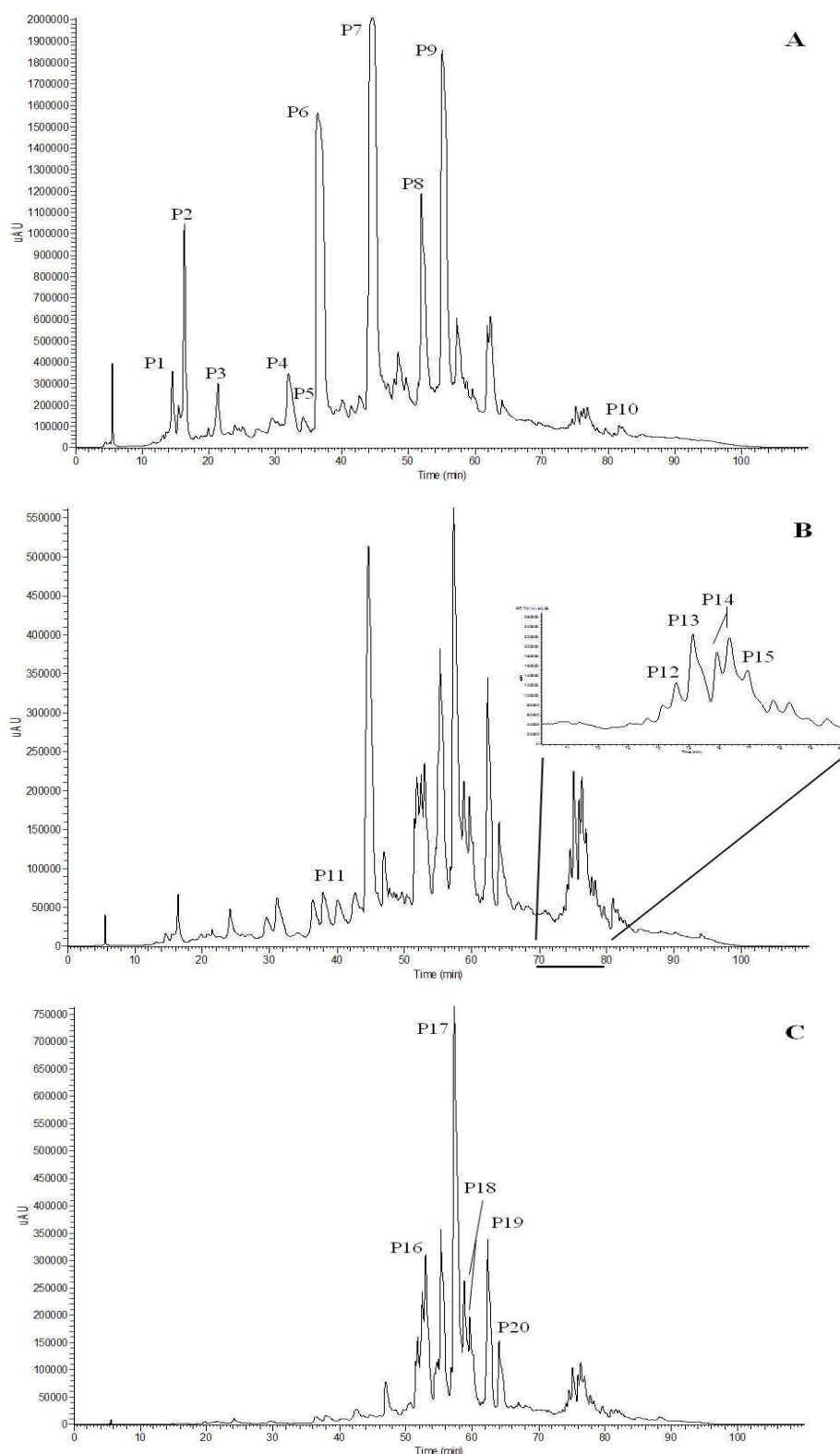


Figura 4. 6 – Cromatograma de HPLC do extracto de resíduo aspirado com acetona (50%) a 280 nm (A), a 320 nm (B) e a 360 nm (C). Picos são: P1 – Ácido hidroxibenzóico; P2 - Ácido gálico; P3 – Galocatequina; P4 - Teofilina; P5 – Catequina não identificada; P6 – Cafeína; P7 - Epicatequina+ Epigalocatequina-3-galato; P8 - Galocatequina-3-galato; P9 - Epicatequina-3-galato+ Catequina-galato; P10 – Teoflavina; P11 - Ácido hidroxicinâmico; P12 - Flavonol glicosilado acilado 1; P13 - Flavonol glicosilado acilado 2; P14 - Flavonol glicosilado acilado 3, P15 - Flavonol glicosilado acilado 4, P16 – Flavonol 1; P17 - Flavonol glicosilado 1; P18 - Flavonol glicosilado 2; P19 - Flavonol glicosilado 3; P20 - Flavonol glicosilado 4.

Os compostos identificados nos extractos aos comprimentos de onda analisados (280 nm, 320 nm e 360 nm) por comparação com padrões ou por comparação com a literatura (Lin *et al.*, 2008; Sakakibara *et al.*, 2003) são listados na tabela 4.13, indicando simultaneamente as suas janelas de retenção, as gamas de concentração em mg/g de extracto seco utilizando como padrão um dos padrões utilizados neste trabalho e os comprimentos de onda onde cada um dos compostos identificados apresenta absorvância máxima.

Tabela 4. 13 - Compostos tentativamente identificados nos extractos analisados (amostra/solvente) aos comprimentos de onda de 280 nm, 320 nm e 360 nm.

| Pico | Nome do Composto | λ | Janela Retenção (minutos) | Gama de Conc. (mg/g de extracto seco) | λ máx. (nm) |
|--|--|-----------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Ácidos hidroxibenzoicos | | | | | |
| P1 | Ácido hidroxibenzóico | 280 | 14,37-14,83 | 1,825-16,255 | 240, 274 |
| P2 | Acido gálico* | 280 | 15,87-17,97 | 0,480-5,805 | 239, 271 |
| Catequinas | | | | | |
| P3 | Galocatequina* | 280 | 21,05-22,68 | 11,710-31,040 | 242, 270 |
| P5 | Catequina | 280 | 31,30-34,12 | 0,550-13,990 | 241, 272 |
| P7 | Epigalocatequina-3-galato* + Epicatequina* | 280 | 43,53-47,57 | 4,275-57,860 | 241, 275; 242, 279 |
| P8 | Galocatequina-3-galato* | 280 | 51,58-52,17 | 1,760-25,465 | 242, 274 |
| P9 | Epicatequina-3-galato*+ Catequina-galato | 280 | 54,89-55,42 | 0,540-19,275 | 241, 277 |
| Metilxantinas | | | | | |
| P4 | Teofilina | 280 | 24,23-26,03 | 0,000-1,650 | 241, 272 |
| P6 | Cafeína* | 280 | 36,43-37,76 | 19,830-40,140 | 240, 272 |
| Teoflavina | | | | | |
| P10 | Teoflavina | 280 | 77,05-79,92 | 0,02-1,605 | 250, 278, 385, 444 |
| Ácido hidroxicinâmico | | | | | |
| P11 | Ácido hidroxicinâmico | 320 | 37,76-38,70 | 0,500-2,870 | 246,325 |
| Flavonóis glicosilados acilados | | | | | |
| P12 | Flavonol glicosilado acilado 1 | 320 | 74,67-74,75 | 0,280-0,790 | 268, 316 |
| P13 | Flavonol glicosilado acilado 2 | 320 | 75,20-76,30 | 0,625-2,640 | 268, 315 |
| P14 | Flavonol glicosilado acilado 3 | 320 | 76,00-76,53 | 0,625-3,430 | 268, 315 |
| P15 | Flavonol glicosilado acilado 4 | 320 | 76,32-77,15 | 0,520-1,315 | 268, 316 |
| Flavonóis | | | | | |
| P16 | Flavonol 1 | 360 | 56,92-57,43 | 3,840-9,120 | 244, 350 |
| Flavonóis glicosilados | | | | | |
| P17 | Flavonol glicosilado 1 | 360 | 58,90-58,93 | 0,755-8,215 | 265, 344 |
| P18 | Flavonol glicosilado 2 | 360 | 59,75-60,27 | 0,880-5,310 | 265, 345 |
| P19 | Flavonol glicosilado 3 | 360 | 62,12-62,60 | 0,155-2,785 | 266, 347 |
| P20 | Flavonol glicosilado 4 | 360 | 63,82-64,72 | 0,575-7,085 | 265, 342 |

*compostos identificados por comparação com padrões

O extracto que apresenta maior teor de ácido hidroxibenzóico ($p < 0,05$) é o extracto obtido a partir do resíduo varredura utilizando como solvente a água. Verifica-se que a água é o melhor solvente, de entre os solventes testados, para extrair este ácido pois o teor dos extractos que utilizaram água como solvente são significativamente superiores aos outros extractos com excepção daqueles que foram preparados a partir do chá preto “Broken Leaf “ (tabela 4.14).

Tabela 4. 14 - Concentração dos ácidos hidroxibenzoicos, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|-----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Ácido hidroxibenzoico | | | |
| “Encosta da Bruma” | 2,220 ^a | 2,140 ^a | 5,040 ^b |
| “Broken Leaf” | 5,440 ^{bc} | 3,360 ^{ab} | 7,395 ^c |
| Aspirado | 1,825 ^a | 2,045 ^a | 5,365 ^{bc} |
| Varredura | 2,810 ^a | 2,240 ^a | 16,255 ^d |
| Ácido gálico | | | |
| “Encosta da Bruma” | 2,085 ^{ab} | 2,370 ^{ab} | 2,115 ^{ab} |
| “Broken Leaf” | 0,935 ^a | 0,480 ^a | 0,740 ^a |
| Aspirado | 4,470 ^{bc} | 5,805 ^d | 4,040 ^{bcd} |
| Varredura | 3,685 ^{bc} | 3,510 ^b | 4,435 ^{cd} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Comparação feita separadamente para cada tipo de composto detectado.

Quanto ao ácido gálico verifica-se que, independentemente do solvente utilizado, o chá preto “Broken Leaf” é aquele que apresenta teores significativamente mais baixos que o teor de ácido gálico dos resíduos (aspirado ou varredura).

Quanto às catequinas foram identificadas algumas das catequinas características do chá, nomeadamente, a galocatequina, a catequina (P5), epicatequina e epigalocatequina-3-galato (P7), galocatequina-3-galato (P8) e epicatequina-3-galato e catequina-3-galato (P9).

A galocatequina é extraída maioritariamente a partir do resíduo aspirado com os solventes de soluções aquosas de acetona e de etanol, com os teores de 31,04 e de 27,61 mg/g extracto seco, respectivamente (tabela 4.15). A menor extracção deste composto foi verificada no extracto aquoso preparado a partir do chá “Broken Leaf” seguido do extracto etanólico (50%) do mesmo chá, com os teores de 11,71 e de 12,815 mg/g extracto seco, respectivamente.

Quanto ao composto do grupo funcional catequina (P5) verifica-se que os teores determinados para os vários extractos preparados a partir do chá “Broken Leaf” são significativamente inferiores a todos os outros extractos com excepção do extracto etanólico (50%) do resíduo aspirado (tabela 4.15). O teor determinado mais elevado foi observado no extracto de acetona a 50% a partir do resíduo aspirado.

Tabela 4. 15 - Concentração das catequinas identificadas nos extractos, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Galocatequina | | | |
| “Encosta da Bruma” | 21,990 ^{bcd} | 22,965 ^{bcd} | 21,140 ^{abcd} |
| “Broken Leaf” | 20,685 ^{abc} | 12,815 ^{ab} | 11,710 ^a |
| Aspirado | 31,040 ^d | 27,640 ^{cd} | 18,345 ^{abc} |
| Varredura | 20,105 ^{abc} | 21,425 ^{abcd} | 22,705 ^{bcd} |
| Catequina (P5) | | | |
| “Encosta da Bruma” | 9,730 ^{cd} | 8,200 ^{bcd} | 6,045 ^b |
| “Broken Leaf” | 2,185 ^a | 0,550 ^a | 0,550 ^a |
| Aspirado | 13,990 ^e | 1,895 ^a | 6,980 ^{bcd} |
| Varredura | 9,750 ^d | 6,125 ^{bc} | 10,505 ^{de} |

Tabela 4.15 (continuação)

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|---|----------------------|-----------------------|---------------------|
| Epicatequina e Epigallocatequina-3-galato | | | |
| “Encosta da Bruma” | 48,205 ^d | 47,100 ^{cd} | 11,500 ^a |
| “Broken Leaf” | 10,000 ^a | 6,435 ^a | 4,275 ^a |
| Aspirado | 57,860 ^d | 49,540 ^d | 25,395 ^b |
| Varredura | 49,330 ^d | 34,465 ^{bc} | 10,820 ^a |
| Galocatequina-3-galato | | | |
| “Encosta da Bruma” | 6,595 ^{ab} | 6,300 ^{ab} | 1,770 ^a |
| “Broken Leaf” | 2,315 ^a | 3,035 ^a | 1,760 ^a |
| Aspirado | 25,465 ^d | 17,450 ^{cd} | 6,210 ^{ab} |
| Varredura | 15,645 ^{bc} | 10,405 ^{abc} | 2,625 ^a |
| Epicatequina-3-galato e Catequina-3-galato | | | |
| “Encosta da Bruma” | 13,205 ^{cd} | 12,275 ^{cd} | 1,415 ^a |
| “Broken Leaf” | 3,800 ^{ab} | 3,150 ^{ab} | 0,830 ^a |
| Aspirado | 19,275 ^e | 14,365 ^{de} | 4,710 ^{ab} |
| Varredura | 14,600 ^{de} | 8,440 ^{bc} | 0,540 ^a |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.
Comparação feita separadamente para cada tipo de composto detectado.

As catequinas epicatequina e epigallocatequina-3-galato, que são identificadas em conjunto por saírem da coluna de HPLC em co-eluição, são extraídas em menor quantidade a partir do chá preto “Broken Leaf” independentemente do solvente utilizado (tabela 4.15). Esta observação era espectável uma vez que as catequinas são destruídas grandemente durante a produção do chá preto no processo de fermentação. Verifica-se ainda que a água é o solvente que menor teor destas catequinas extrai pois são nesses extractos que se observam os menores teores. Todos os extractos do chá “Broken Leaf” em conjunto com os extractos de água, exceptuando-se o extracto aquoso de aspirado, são extractos que apresentam os teores significativamente mais baixos que todos os outros extractos analisados. Os maiores teores são observados nos extractos aquosos de solventes orgânicos (50%) para o resíduo aspirado com valores de 49,540 e de 57,860 mg/g extracto seco para os extractos etanólico e de acetona, respectivamente.

De modo semelhante ao verificado para as catequinas do pico anterior considerado (epicatequina e epigallocatequina-3-galato), observou-se, relativamente à galocatequina-3-galato, que todos os extractos do chá “Broken Leaf” em conjunto com os extractos de água, exceptuando-se o extracto aquoso de aspirado, são extractos que apresentam os valores de concentração mais baixos em relação a todos os outros extractos analisados. Também aqui os maiores teores de galocatequina-3-galato são observados nos extractos aquosos de acetona e de etanol, ambos a 50%, obtidos a partir do resíduo aspirado, os quais, neste caso, são significativamente superiores a todos os extractos obtidos a partir dos chás verde e preto.

Para o conjunto das catequinas epicatequina-3-galato e catequina-3-galato verifica-se que para cada um dos solventes é para o resíduo aspirado que se obtém a maior quantidade extraída, sendo o maior teor determinado no extracto de acetona. Os menores teores são observados para os extractos aquosos de varredura e dos chás “Broken Leaf” e “Encosta da Bruma”, com valores de 0,540, 0,830 e de 1,415 mg/g extracto seco, respectivamente.

Relativamente às metilxantinas, nomeadamente à teofilina verifica-se que a maior concentração, a qual é significativamente superior a todas as outras concentrações determinadas, é determinada para o extracto aquoso do resíduo varredura, com um teor de 1,650 mg/g extracto seco (tabela 4.16). Verifica-se ainda que a teofilina não é extraível, de qualquer uma das matrizes analisadas, com a solução aquosa de acetona a 50%.

Tabela 4. 16 - Concentração das metilxantinas, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Teofilina | | | |
| “Encosta da Bruma” | 0,000 ^a | 0,165 ^{ab} | 0,415 ^{abc} |
| “Broken Leaf” | 0,000 ^a | 0,540 ^{abc} | 0,955 ^c |
| Aspirado | 0,000 ^a | 0,555 ^{bc} | 0,205 ^{ab} |
| Varredura | 0,000 ^a | 0,220 ^{ab} | 1,650 ^d |
| Cafeína | | | |
| “Encosta da Bruma” | 29,440 ^{cde} | 30,565 ^{de} | 24,345 ^{abc} |
| “Broken Leaf” | 40,140 ^f | 26,205 ^{bcd} | 22,685 ^{ab} |
| Aspirado | 33,570 ^e | 30,335 ^{cde} | 19,830 ^a |
| Varredura | 33,565 ^e | 27,665 ^{bcd} | 26,850 ^{bcd} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Comparação feita separadamente para cada tipo de composto detectado.

A cafeína é extraída maioritariamente pela acetona a partir dos resíduos de chá (aspirado e varredura) e do chá preto “Broken Leaf”, sendo este último o extracto que apresenta um teor significativamente superior a todos os outros extractos, com valor de 40,140 mg/g extracto seco (tabela 4.16). Em contrapartida, os menores teores observados foram nos extractos aquosos do resíduo aspirado, “Encosta da Bruma” e de “Broken Leaf” com teores de 19,830, 22,685 e de 24,345 mg/g extracto seco, respectivamente.

Os valores de teoflavina mais elevados são observados nos extractos de acetona (50%) dos resíduos analisados (aspirado e varredura), seguido dos extractos do chá preto “Broken Leaf”, independentemente do solvente (tabela 4.17). Os menores teores são observados nos extractos etanólicos (50%), com excepção do extracto de chá preto.

Tabela 4. 17 - Concentração da teoflavina, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| “Encosta da Bruma” | 0,510 ^{ab} | 0,075 ^a | 0,335 ^a |
| “Broken Leaf” | 0,840 ^{ab} | 0,935 ^{ab} | 0,550 ^{ab} |
| Aspirado | 1,605 ^a | 0,020 ^a | 0,130 ^a |
| Varredura | 1,075 ^{ab} | 0,065 ^a | 0,300 ^a |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Em relação ao ácido hidroxicinâmico verifica-se que os maiores teores observados correspondem aos extractos de chá verde “Encosta da Bruma”, sendo mesmo os valores dos extractos de acetona (50%) e de etanol (50%) significativamente superiores a todos os outros valores determinados, com 2,870 e 2,605 mg/g extracto seco, respectivamente (tabela 4.18).

Tabela 4. 18 - Concentração do ácido hidroxicinâmico, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| “Encosta da Bruma” | 2,870 ^c | 2,605 ^c | 1,675 ^b |
| “Broken Leaf” | 1,160 ^{ab} | 0,640 ^a | 0,500 ^a |
| Aspirado | 1,090 ^{ab} | 1,375 ^{ab} | 0,770 ^a |
| Varredura | 1,180 ^{ab} | 0,740 ^a | 0,960 ^{ab} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Quanto aos flavonóis glicosilados acilados, os extractos que apresentam maiores teores destes compostos são os que são preparados a partir do resíduo aspirado e utilizando como solvente as soluções aquosas a 50% de etanol e de acetona (tabela 4.19). No caso do flavonol glicosilado acilado 4, esses teores são ultrapassados pelo extracto de acetona (50%) a partir de chá “Broken Leaf”.

Os menores teores são observados nos extractos aquosos de chá (“Broken Leaf” e “Encosta da Bruma”), tendo os extractos água / “Broken Leaf” sempre teores inferiores. No caso do flavonol glicosilado acilado 4, o extracto água / “Encosta da Bruma” tem o seu teor superior também ao extracto água/aspirado.

Tabela 4. 19 - Concentração dos flavonóis glicosilados acilados, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente, para cada um dos compostos detectados com este grupo funcional.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| flavonol glicosilado acilado 1 | | | |
| “Encosta da Bruma” | 0,435 ^{ab} | 0,435 ^{ab} | 0,320 ^a |
| “Broken Leaf” | 0,610 ^{bc} | 0,440 ^{ab} | 0,280 ^a |
| Aspirado | 0,790 ^c | 0,710 ^{bc} | 0,435 ^a |
| Varredura | 0,690 ^{bc} | 0,530 ^{abc} | 0,45 ^{ab} |
| flavonol glicosilado acilado 2 | | | |
| “Encosta da Bruma | 1,005 ^{ab} | 0,965 ^{ab} | 0,680 ^a |
| Broken Leaf” | 1,710 ^{abc} | 1,110 ^{ab} | 0,625 ^a |
| Aspirado | 1,865 ^{bc} | 2,640 ^c | 0,965 ^{ab} |
| Varredura | 1,655 ^{abc} | 1,425 ^{ab} | 1,090 ^{ab} |
| flavonol glicosilado acilado 3 | | | |
| “Encosta da Bruma” | 1,410 ^{abc} | 1,220 ^{abc} | 0,770 ^{ab} |
| “Broken Leaf” | 2,205 ^{bcd} | 1,420 ^{abc} | 0,625 ^a |
| Aspirado | 2,465 ^{cd} | 3,430 ^d | 1,195 ^{abc} |
| Varredura | 2,215 ^{bcd} | 1,720 ^{abc} | 1,265 ^{abc} |
| flavonol glicosilado acilado 4 | | | |
| “Encosta da Bruma” | 0,895 ^{bcde} | 0,775 ^{abcd} | 0,610 ^{abc} |
| “Broken Leaf” | 1,315 ^f | 0,955 ^{cdef} | 0,520 ^a |
| Aspirado | 1,245 ^{ef} | 1,265 ^{ef} | 0,540 ^{ab} |
| Varredura | 1,125 ^{def} | 0,865 ^{abcd} | 0,630 ^{abc} |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey. Comparação feita separadamente para cada tipo de composto detectado.

Em relação a este composto, flavonol, não se encontram diferenças significativas entre os vários extractos, observando-se apenas que todos os extractos de água têm teores inferiores aos extractos obtidos com os outros solventes utilizados (tabela 4.20).

Tabela 4. 20 - Concentração do flavonol, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| “Encosta da Bruma” | 9,120 ^a | 7,225 ^a | 5,470 ^a |
| “Broken Leaf” | 7,810 ^a | 5,925 ^a | 3,840 ^a |
| Aspirado | 8,150 ^a | 8,215 ^a | 4,960 ^a |
| Varredura | 8,835 ^a | 7,430 ^a | 5,210 ^a |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey.

Os flavonóis glicosilados detectados nos extractos, apesar de terem o mesmo grupo funcional, têm comportamento variado em relação aos solventes utilizados. Assim, em relação ao flavonol glicosilado 1, o qual é o composto maioritário deste grupo funcional, a água é o solvente que apresenta menor apetência para extrair este composto das matrizes utilizadas, apresentando mesmo diferenças significativas em relação aos teores deste composto extraídos pela solução etanólica (50%), com excepção do extracto a partir do chá “Broken Leaf”. No entanto são os extractos etanólicos que apresentam os maiores valores (tabela 4.21).

Em relação ao flavonol glicosilado 2, verifica-se que o extracto etanólico (50%) do resíduo aspirado apresenta teores significativamente superiores a todos os outros extractos. O que apresenta menor teor deste composto é o extracto de acetona (50%) do mesmo resíduo, o aspirado.

O flavonol glicosilado 3 é extraído preferencialmente pela água, observando-se teores significativamente superiores para os extractos aquosos dos chás e do resíduo aspirando, sendo mesmo o teor do extracto “Encosta da Bruma” significativamente superior.

No que diz respeito ao flavonol glicosilado 4, verifica-se que são os extractos de água, para as diversas matriz, que apresentam os menores teores ($p < 0,05$). Os extractos de acetona (50%) a partir dos chás são aqueles que apresentam teores mais elevados, nomeadamente, de 7,085 e de 6,095 mg/g extracto seco para o extracto de “Encosta da Bruma” e de “Broken Leaf”, respectivamente.

Tabela 4. 21 - Concentração dos flavonóis glicosilados, expressa em mg/g extracto seco, determinada em cada extracto analisado, em função da amostra e do solvente, para cada um dos compostos detectados com este grupo funcional.

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| flavonol glicosilado 1 | | | |
| “Encosta da Bruma” | 2,560 ^{abcd} | 7,225 ^{bcd} | 1,085 ^a |
| “Broken Leaf” | 1,535 ^{ab} | 5,925 ^{abcd} | 0,755 ^a |
| Aspirado | 1,640 ^{abc} | 8,215 ^d | 1,080 ^a |
| Varredura | 2,475 ^{abcd} | 7,430 ^{cd} | 1,270 ^a |
| flavonol glicosilado 2 | | | |
| “Encosta da Bruma” | 2,375 ^{bcd} | 2,540 ^{cd} | 2,110 ^{abcd} |
| “Broken Leaf” | 1,505 ^{abc} | 2,040 ^{abcd} | 1,385 ^{abc} |
| Aspirado | 0,880 ^a | 5,310 ^e | 1,265 ^{ab} |
| Varredura | 2,385 ^{bcd} | 2,080 ^{abcd} | 3,2850 ^d |

Tabela 4.21 (Continuação)

| Amostra / Solvente | Acetona (50%) | Etanol (50%) | Água |
|------------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| flavonol glicosilado 3 | | | |
| “Encosta da Bruma” | 0,160 ^a | 0,165 ^a | 2,785 ^c |
| “Broken Leaf” | 0,240 ^a | 0,155 ^a | 2,185 ^b |
| Aspirado | 0,180 ^a | 0,185 ^a | 1,745 ^b |
| Varredura | 0,190 ^a | 0,170 ^a | 0,185 ^a |
| flavonol glicosilado 4 | | | |
| “Encosta da Bruma” | 7,085 ^e | 5,305 ^{cd} | 0,920 ^a |
| “Broken Leaf” | 6,095 ^{de} | 4,715 ^{bc} | 0,665 ^a |
| Aspirado | 4,800 ^{bcd} | 5,295 ^{cd} | 0,680 ^a |
| Varredura | 4,725 ^{bc} | 3,595 ^b | 0,575 ^a |

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com o teste de Tukey. Comparação feita separadamente para cada tipo de composto detectado.

Considerando as concentrações individuais dos compostos seleccionados observaram-se correlações fortes da concentração de galocatequina, cafeína, epigalocatequina-3-galato e epicatequina, epigalocatequina-3-galato, epicatequina-3-galato e catequina-3-galato, flavonóides glicosilado acilado 1, 2, 3 e 4, flavonol 1 e o flavonol glicosilado 4 com a actividade antioxidante avaliada pela reacção de Folin-Ciocalteu (tabela 4.22). A actividade antiradicalar relativa ao radical DPPH apresenta correlações fortes com os mesmos compostos sendo mesmo muito fortes no caso das catequinas epicatequina-3-galato e catequina-3-galato.

Tabela 4. 22 - Correlações de Pearson entre as propriedades antioxidantes dos extractos analisados e os compostos fenólicos determinados.

| Correlações de Pearson | Folin-Ciocalteu | DPPH | FRAP |
|--|-----------------|----------|----------|
| Ácido hidroxibenzóico | -0,502** | -0,499** | -0,407** |
| Acido gálico | 0,593* | 0,485* | 0,741* |
| Galocatequina | 0,803* | 0,723* | 0,765* |
| Teofilina | -0,498** | -0,555* | -0,405** |
| Catequina | 0,432** | 0,533* | 0,569* |
| Cafeína | 0,692* | 0,734* | 0,458** |
| Epigalocatequina-3-galato + Epicatequina | 0,840* | 0,861* | 0,058* |
| Galocatequina-3-galato* | 0,832* | 0,784* | 0,842* |
| Epicatequina-3-galato*+ Catequina-galato | 0,874* | 0,901* | 0,833* |
| Teoflavina | 0,261 | 0,387 | 0,169 |
| Ácido hidroxicinâmico | 0,293 | 0,399 | 0,231 |
| Flavonóis glicosilados acilados 1 | 0,855* | 0,810* | 0,760* |
| Flavonóis glicosilados acilados 2 | 0,793* | 0,680* | 0,674* |
| Flavonóis glicosilados acilados 3 | 0,825* | 0,732* | 0,702* |
| Flavonóis glicosilados acilados 4 | 0,795* | 0,770* | 0,568* |
| Flavonol 1 | 0,738* | 0,778* | 0,630* |
| Flavonóis glicosilados 1 | 0,313 | 0,220 | 0,236 |
| Flavonóis glicosilados 2 | 0,299 | 0,208 | 0,304 |
| Flavonóis glicosilados 3 | -0,611* | -0,651* | -0,490** |
| Flavonóis glicosilados 4 | 0,665* | 0,728* | 0,431 |

*A correlação é significativa no nível 0,01. **A correlação é significativa no nível 0,05.

Já no caso da actividade redutora férrica observam-se correlações fortes com as concentrações de ácido gálico, galocatequina, epigallocatequina-3-galato e epicatequina, epigallocatequina-3-galato, epicatequina-3-galato e catequina-3-galato, flavonóides glicosilado acilado 1, 2, 3 e 4 e flavonol 1.

4.3.4 - Actividade antimicrobiana de extractos de chás verde e preto e de dois resíduos da fábrica de chá (Gorreana)

Neste estudo, extractos de chá verde (“Encosta da Bruma”), chá preto (“Broken Leaf”) e dos resíduos da fábrica Gorreana (Aspirado e Varredura) de água e das soluções aquosas a 50% de acetona e de etanol, com extracção durante 24 horas foram avaliados quanto à actividade antibacteriana com quatro espécies de microrganismos diferentes: *Staphylococcus aureus* (bactéria gram-positiva), *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Escherichia coli* (bactéria gram-negativa) e *Candida albicans* (levedura). O efeito inibitório de extractos aquosos e de solventes aquosos sobre o crescimento dos organismos de teste é apresentada na tabela 4.23. Os testes de controlo realizados com os solventes de extracção utilizados mostraram que estes não apresentaram efeitos inibidores sobre os organismos testados.

Tabela 4. 23 - Actividade antimicrobiana dos extractos de água e de soluções aquosas de etanol e de acetona (50%).

| Solvente | Amostra | Halo de inibição (mm) | | | |
|---------------|--------------------|------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
| | | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>S. aureus</i> resistente à metilicina | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> |
| Acetona (50%) | “Encosta da Bruma” | 14,3±0,6 ^c | 15,7±0,6 ^{cd} | - | - |
| | “Broken Leaf” | - ^a | - ^a | - | - |
| | Aspirado | 14,3±0,6 ^c | 16,7±0,6 ^d | - | - |
| | Varredura | 13,0±1,0 ^c | 15,7±0,6 ^{cd} | - | - |
| Etanol (50%) | “Encosta da Bruma” | 12,7±0,6 ^c | 13,7±0,6 ^c | - | - |
| | “Broken Leaf” | - ^a | - ^a | - | - |
| | Aspirado | 14,0±0,0 ^c | 15,0±0,0 ^{cd} | - | - |
| | Varredura | 12,3±0,6 ^c | 14,0±0,0 ^{cd} | - | - |
| Água | “Encosta da Bruma” | 8,0±0,0 ^b | 8,3±1,2 ^b | - | - |
| | “Broken Leaf” | - ^a | - ^a | - | - |
| | Aspirado | 8,7±0,6 ^b | 9,7±0,6 ^b | - | - |
| | Varredura | - ^a | - ^a | - | - |

Os valores são expressos como média±desvio padrão dos testes feitos em triplicado.

^a - Sem zona de inibição detectada;

Letras diferentes em expoente indicam diferenças significativas (p<0,05) de acordo com o teste de Tukey. Comparação feita separadamente para cada bactéria.

Nenhuma das amostras testadas apresentou actividade antimicrobiana contra *E.coli* nem contra *Candida albicans*, no entanto, essa actividade foi verificada nalguns extractos relativamente a *S. aureus* e a *S. aureus* resistente à metilicina. Qualquer dos extractos de chá preto “Broken Leaf” e o extracto aquoso do resíduo Varredura não apresentaram qualquer actividade em relação a ambas as estirpes de *S. aureus* testadas. Os extractos aquosos de chá verde “Encosta da Bruma” e de resíduo Aspirado apresentaram uma actividade baixa mas que foi significativamente superior aos brancos. Os extractos etanólicos e de acetona a 50% de todas as amostras, excepto “Broken Leaf”, apresentaram actividade antimicrobiana em relação a estas estirpes de *S. aureus*; no caso do *S. aureus* resistente à

meticilina verificou-se que o extracto em acetona do resíduo Aspirado foi o mais activo e o extracto etanólico de chá “Encosta da Bruma” o menos activo.

Alguns estudos mostram que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina são sensíveis à presença de extractos provenientes de chá verde (Cho *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Turkmen e colaboradores (Turkmen *et al.*, 2007) mostrou que *Staphylococcus aureus* foi sensível aos extractos de chá preto idênticos aos utilizados neste estudo, o que se deve provavelmente à concentração de fenólicos do extracto preparado, nomeadamente, de catequinas, e, consequentemente, devido ao tipo de chá preto utilizado cujo teor é dependente do processo de fermentação e da origem do chá. Estes mesmos extractos não foram eficazes em *Escherichia coli* O157: H7 (Turkmen *et al.*, 2007). Noutro estudo (Almajano *et al.*, 2005) a *E. coli* foi inibida apenas muito fracamente para alguns dos extractos utilizados, nomeadamente, pelo chá branco, pelo chá verde e por um chá comercial (CI2).

Foram obtidos resultados positivos com *E. coli* quando taninos foram expostos a oxigénio (Smith *et al.*, 2003). Os taninos alteraram o seu nível de oxidação resultando a produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) quando estes foram colocados em condições aeróbicas. A presença de H_2O_2 conduziu à maior sensibilização da *E. coli*, ou seja, à sua inibição. A autooxidação não enzimática dos grupos hidroxilo resulta na formação de H_2O_2 (Singleton, 1987).

Alguns estudos (Chou *et al.*, 1999; Almajano *et al.*, 2005) mostraram que o chá verde, chá não fermentado, apresenta uma forte actividade antimicrobiana a qual é superior à actividade apresentada pelo chá preto, chá totalmente fermentado.

Num outro estudo (Bakkir *et al.*, 2011) foram testados os efeitos *in vitro* de diferentes concentrações de chá verde e preto em *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Várias concentrações de chá verde (1,25, 2,5, 5 e 10 g de folha de chá/100mL) inibem claramente o crescimento do MRSA (zona de inibição: 5, 10, 15 e 20 mm, respectivamente). Este efeito inibitório foi proporcional à quantidade de chá verde presente na infusão. Para as mesmas concentrações de chá preto o efeito inibitório foi menor tendo-se determinado, para as soluções de 5 e de 10 g de folha de chá/100mL, uma zona de inibição de 5 e de 15 mm, respectivamente (Bakkir *et al.*, 2011).

Outro estudo mostrou que os extractos de chá verde podem inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, incluindo as resistentes à meticilina (MRSA), por vezes completamente (Yam *et al.*, 1997; Hamilton-Miller & Shah, 1999; Staszewski *et al.*, 2011). Usando a microscopia electrónica um outro estudo mostrou que o método de acção para este efeito são as alterações profundas na parede celular e consequentemente a inibição da divisão celular (Hamilton-Miller & Shah, 1999). Este grave desorganização da arquitetura da parede celular sugere que os componentes do chá interferem com a síntese do peptidoglicano e compromete o processo de separação de células (Staszewski *et al.*, 2011). Além disso, os polifenóis podem modular e reduzir a halotolerância de *S. aureus* e a sua resistência a vários antibióticos, indicando dano da parede celular por ligação directa de catequinas a peptidoglicano (Stapleton *et al.*, 2006; Stapleton *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2001).

Num estudo realizado por Okubo e colaboradores (Okubo *et al.*, 1991) não se verificou qualquer actividade antimicrobiana com *Candida albicans* por aplicação de extractos de chá. O mesmo não se verificou noutro estudo (Almajano *et al.*, 2005) em que *C. albicans* foi inibida pelos extractos de chá verde e branco e de alguns chás comerciais (CI2 e CI3). Verificaram ainda que esta levedura foi mais resistente do que foram algumas espécies de *Bacillus*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*.

Estudos anteriores relataram que os polifenóis do chá têm actividade bactericida contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas (Blanco *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 1998).

As bactérias gram-positivas, como é o caso de *Staphylococcus aureus* são mais sensíveis aos extractos de chá do que as bactérias gram-negativas, como é o caso de *Escherichia coli*. A maior resistência de bactérias gram-negativas é atribuída à presença de lipopolissacarídeos nas suas membranas externas (Alzoreky & Nakahara, 2003; Baydar *et al.*, 2004). No entanto, um estudo mostrou que *E. coli* tratada com polifenóis de chá sofreu alterações nos ácidos gordos saturados e insaturados nas suas membranas celulares (Cho *et al.*, 2007).

Alguns autores (Ikigai *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 2001) propuseram que uma das razões para as bactérias gram-negativas serem mais resistentes às catequinas do que as gram-positivas é a presença de uma forte carga negativa conferida por lipopolissacarídeo na superfície de bactérias gram-negativas. Assim, a membrana externa de microrganismos gram-negativos actua como uma barreira, devido à repulsão entre as catequinas e as da superfície da célula.

No entanto, a selectividade de ECG purificada e EGCG entre *S. aureus* e o resto dos patogénios testados no estudo em causa pode não estar relacionada com a coloração de Gram desde tanto as bactérias gram positivas e negativas foram consideradas relativamente resistentes (Si *et al.*, 2006). Isto pode sugerir que os polifenóis não afectam os componentes da parede celular de bactérias, que são associados com a coloração de Gram, mas sim componentes associados às diferenças fisiológicas intrínsecas entre *S. aureus* e outras bactérias. A observação do estudo de Si e colaboradores (Si *et al.*, 2006) e os resultados apresentados por outros investigadores (Hamilton-Miller & Shah, 1999) também sugerem que a divisão celular pode ter sido o alvo dos polifenóis do chá, porque todas as células afectadas mostraram algum grau de divisão incompleta (Si *et al.*, 2006).

Muitos estudos demonstraram a actividade antimicrobiana dos extractos de chá contra o crescimento de alguns microorganismos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, os quais podem ser patogénicos (Chou *et al.*, 1999).

Os polifenóis de chá são potentes “eliminadores” de radicais livres, devido aos grupos hidroxilo na sua estrutura química. Os grupos hidroxilo podem formar complexos com os radicais livres e neutralizá-los, prevenindo na progressão do processo de doença e nas reacções de inflamação (Ichihashi *et al.*, 2000). Além disso, os polifenóis do chá verde têm demonstrado significativa acção antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatório, e propriedades antimicrobianas em vários humanos, animais e estudos *in vitro* (Choi *et al.*, 2004; Crespy & Williamson, 2004; Kakuda, 2002; Sung *et al.*, 2000).

A actividade antimicrobiana, como referido anteriormente, em geral diminuiu quando a extensão de fermentação do chá aumentou (Chou *et al.*, 1999; Almajano *et al.*, 2008), ou seja, o chá verde (chá não fermentado) tem maior actividade antimicrobiana que o chá preto (chá totalmente fermentado).

Não há dados sobre os mesmos materiais, no que respeita aos resíduos das fábricas de chá, na literatura. No entanto, as diferenças na actividade antibacteriana de vários extractos com solventes têm sido relatadas em estudos anteriores, por exemplo, com semente de espinheiro (Negi *et al.*, 2005), com semente de uva (Baydar *et al.*, 2004), bagaço de uva (Ozcan *et al.*, 2004) e mesmo com chá (Turkmen *et al.*, 2007).

No estudo realizado por Ozcan e colaboradores (Ozcan *et al.*, 2004) foi mostrado que as bactérias testadas, nas quais se incluem *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Staphylococcus aureus*, foram inibidas por concentrações do extracto de bagaço de uva de 2,5, 5, 10 e 20%, com halos de inibição que variaram entre 9,0 e 22,0 mm para *E. Coli*, entre 7,67 e 23,67 mm para *E. coli* O157:H7 e entre 5,0 e 15,0 mm para *S. aureus*. De acordo com o método utilizado por Ozcan, o *S. aureus* foi mais sensível do que *E. coli* O157: H7 em relação aos extractos utilizados (Ozcan *et al.*, 2004).

As actividades antimicrobianas em relação a estas duas estirpes de *S. aureus* apresentaram correlações fortes com as actividades antioxidantes avaliadas pela reacção de Folin-Ciocalteu, pela reacção de sequestração do DPPH e pela actividade redutora férrica, em particular com as duas primeiras. Os coeficientes de correlação foram mais elevados para o *S. aureus* com resistência à metilicina o que reforça a importância da actividade antioxidante dos extractos na sua capacidade de inibição desta estirpe (tabela 4.24).

Tabela 4. 24 - Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e as propriedades antioxidantes para os extractos analisados.

| Correlações de Pearson | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina |
|------------------------|------------------------------|--|
| Folin-Ciocalteu | 0,824* | 0,835* |
| DPPH | 0,814* | 0,844* |
| FRAP | 0,719* | 0,757* |

*A correlação é significativa no nível 0,01. **A correlação é significativa no nível 0,05.

Um estudo realizado por Si e seus colaboradores (Si *et al.*, 2006) demonstraram a relação directa entre o teor de polifenóis e a actividade antimicrobiana do extracto de chá verde chinês. Estes autores purificaram as catequinas a partir do chá verde chinês pelo método HSCCC (Cromatografia de alta eficiência em contracorrente). A percentagem de cada um dos compostos individuais principais purificados a partir do extracto de chá bruto inicial foram de 26,0% de epicatequina galato, 15,3% de epigallocatequina galato, 1,6% de epicatequina e de 0,9% de cafeína e as suas actividades antimicrobianas para *S. aureus* (MSSA) e *E. coli* O157: H7. Com soluções, com concentrações de 500 µg/L, EGCG inibiu o crescimento de ambos os organismos patogénicos por mais do que 80%, ao passo que o ECG só inibiu o crescimento de *S. aureus* (MSSA). EC inibiu o crescimento de *S. aureus* (MSSA) em 92%, após 6 horas de incubação. No entanto, o grau de inibição foi reduzido para 19% após 24 h (Si *et al.*, 2006).

Os somatórios das áreas cromatográficas avaliadas por HPLC-DAD a diferentes comprimentos de onda, apresentaram também correlações fortes (280 nm, 320 nm e 360 nm) com as actividades antimicrobianas relativamente às estirpes de *S. aureus* testadas (tabela 4.25).

Tabela 4. 25 - Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e os somatórios determinados a 280 nm, 320 nm e 360 nm para os extractos analisados.

| Correlações de Pearson | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina |
|----------------------------|------------------------------|--|
| Somatórios a 280 nm | 0,841* | 0,843* |
| Somatórios a 320 nm | 0,788* | 0,771* |
| Somatórios a 360 nm | 0,815* | 0,790* |

*A correlação é significativa no nível 0,01. **A correlação é significativa no nível 0,05.

A correlação forte encontrada com o somatório das áreas cromatográficas a 280 nm é uma indicação da relevância dos compostos que mais contribuem para este somatório como é o caso das catequinas e metilxantinas.

A resposta obtida para os diferentes microorganismos foi confirmado por diversos estudos (Kim *et al.*, 2004; Si *et al.*, 2006; Staszewski *et al.*, 2011) que mostraram que o chá verde é mais eficaz para *S. aureus* do que para *E. coli* O157: H7.

As famílias de compostos fenólicos cuja concentração nos extractos apresentou uma correlação forte com a actividade antimicrobiana relativa às duas estirpes testadas foram as catequinas, os flavonóis e os ácidos hidroxicinâmicos; estes dois últimos apesar de se encontrarem nos extractos em concentrações bastante inferiores às catequinas contribuem aparentemente de forma significativa para a actividade antimicrobiana dos mesmos (tabela 4.26).

Tabela 4. 26 - Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e as famílias de compostos observadas nos extractos analisados.

| Correlações de Pearson | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina |
|---------------------------------|------------------------------|---|
| Ácidos hidroxibenzóicos | -0,790* | -0,773* |
| Catequinas | 0,848* | 0,866* |
| Metilxantinas | 0,573** | 0,584** |
| Teoflavinas | 0,301 | 0,399 |
| Ácidos hidroxicinâmicos | 0,767* | 0,795* |
| Flavonóis glicosilados acilados | 0,595* | 0,608* |
| Flavonóis | 0,681* | 0,693* |
| Flavonóis glicosilados | 0,617* | 0,550** |

*A correlação é significativa no nível 0,01. **A correlação é significativa no nível 0,05.

Estes dois grupos de polifenóis, já anteriormente, apresentaram uma correlação forte com a actividade antioxidante, principalmente com os testes Folin-Ciocalteu e com a actividade antiradicalar.

Estudos mostraram que estas correlações entre a inibição de *Staphylococcus aureus* são tanto mais fortes, quanto maior for o teor de catequinas nos extractos (Chou *et al.*, 1999).

Os flavonóis e os ácidos hidroxicinâmicos são famílias de compostos cuja actividade antioxidante específica é descrita como sendo geralmente superior a outros grupos de compostos fenólicos o que poderá explicar a sua actividade antimicrobiana mesmo em concentrações mais reduzidas.

Um estudo de revisão (Cushnie & Lamb, 2005) identifica as estruturas de flavonóides que possuem actividade antibacteriana. Assim, exemplos de alguns flavonóides e de algumas famílias identificados neste estudo de revisão foram os seguintes: apigenina, galangina, pinocembrina, ponciretina, naringina e naringenina, epigallocatequina galato e seus derivados, luteolina e luteolina-7-glicosídeo, a quercetina, 3-O-glicosídeos-metilquercetina e vários flavonóis glicosilados de quercetina e kaempferol e seus derivados, outras flavonas flavonas glicosiladas, as isoflavonas, flavanonas, isoflavanones, flavonóis, flavonoides glicosilados e chalconas com actividade antibacteriana também foram identificados (Cushnie & Lamb, 2005).

As concentrações de alguns grupos de flavonóis apresentaram ainda correlações fortes com a actividade antimicrobiana em relação a uma das estirpes: flavonóis glicosilados relativamente a *S. aureus* e flavonóis glicosilados acilados relativamente a *S. aureus* resistente à meticilina.

A concentração dos ácidos hidroxibenzóicos nos extractos apresenta uma correlação forte e negativa com as actividades antimicrobianas observadas porque este grupo de compostos é o único grupo de

fenólicos cuja concentração aumenta nos extractos aquosos por comparação com os extractos de etanol ou acetona a 50%; no entanto, os extractos aquosos têm muito menor contracção de todos os outros compostos fenólicos ou seja têm muito menor concentração de compostos fenólicos totais pelo que, apresentam menor actividade antioxidante e menor actividade antimicrobiana.

Considerando as concentrações de compostos individuais dos extractos verifica-se que as catequinas EC+EGCG e ECG+CG apresentam correlações muito fortes com a actividade antimicrobiana o que deverá resultar da sua actividade específica mas também da sua elevada concentração nos extractos de acetona e de etanol a 50% (tabela 4.27).

Tabela 4. 27 Correlações de Pearson entre a actividade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e os compostos determinados nos extractos analisados.

| Correlações de Pearson | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina |
|--|------------------------------|--|
| Ácidos hidroxibenzoicos | | |
| Ácido hidroxibenzóico | -0,859* | -0,847* |
| Acido gálico* | 0,009 | 0,034 |
| Catequinas | | |
| Galocatequina* | 0,377 | 0,348 |
| Catequina | 0,013 | 0,084 |
| Epigalocatequina-3-galato* + Epicatequina* | 0,924* | 0,926* |
| Galocatequina-3-galato* | 0,684* | 0,724* |
| Epicatequina-3-galato*+ Catequina-galato | 0,906* | 0,921* |
| Metilxantinas | | |
| Teofilina | -0,726* | -0,757* |
| Cafeína* | 0,645* | 0,660* |
| Teoflavina | | |
| Teoflavina | 0,301 | 0,399 |
| Ácido hidroxicinâmico | | |
| Ácido hidroxicinâmico | 0,346 | 0,255 |
| Flavonóis glicosilados acilados | | |
| Flavonol glicosilado acilado 1 | 0,573** | 0,628* |
| Flavonol glicosilado acilado 2 | 0,503** | 0,507** |
| Flavonol glicosilado acilado 3 | 0,559** | 0,565** |
| Flavonol glicosilado acilado 4 | 0,767* | 0,795* |
| Flavonóis | | |
| Flavonol 1 | 0,681* | 0,693* |
| Flavonóis glicosilados | | |
| Flavonol glicosilado 1 | 0,440 | 0,386 |
| Flavonol glicosilado 2 | 0,042 | -0,032 |
| Flavonol glicosilado 3 | -0,507** | -0,503** |
| Flavonol glicosilado 4 | 0,897* | 0,898* |

*A correlação é significativa no nível 0,01. **A correlação é significativa no nível 0,05.

As concentrações de cafeína, a GCG e alguns flavonóis (flavonol glicosilado acilado 4, flavonol 1 e flavonol glicosilado 4) apresentaram correlações fortes com a actividade antimicrobiana relativa às duas estirpes de *S. aureus*.

Finalmente o flavonol glicosilado acilado 1 apresenta uma correlação forte apenas com a actividade antimicrobiana relativamente a *S. aureus* resistente à metilina.

O ácido hidroxibenzóico 1 e a teofilina foram os compostos fenólicos que apresentaram correlações negativas fortes com a actividade antimicrobiana pois, ao contrário dos restantes fenólicos, a concentração destes compostos aumenta nos extractos de água. Apesar deste aumento, porque a concentração dos outros compostos fenólicos presentes diminuem, os extractos apresentam menor actividade antioxidante e menor actividade antimicrobiana.

A actividade antibacteriana de extractos de plantas é atribuída aos compostos fenólicos individuais (Sakanaka *et al.*, 2000; Jayaprakasha *et al.*, 2003; Ozcan *et al.*, 2004).

Há boas evidências de que os componentes de catequinas do chá verde são responsáveis pela actividade antibacteriana observada e que EGC, EGCG e ECG constituem os agentes antibacterianos mais importantes (Taylor *et al.*, 2005).

Um estudo utilizando uma solução pura (>97%) de polifenóis de chá, e cuja composição foi determinada por HPLC como contendo aproximadamente 50% epigallocatequina-3-galato, 24% epicatequina-3-galato, 16% galocatequina-3-galato, 2% epicatequina e 1% epigallocatequina, mostrou que incubando os microorganismos orais com 2,000 µg/mL de polifenóis de chá durante 5 minutos, ou indivíduos gargarejando durante 1 a 5 minutos, 20 mL da mesma solução, os polifenóis do chá exercem uma toxicidade eficaz nas células de microorganismos orais, como é o caso de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (Cho *et al.*, 2010).

A epigallocatequina-3-galato, constituinte principal dos extractos de chá (cerca de 50%) na solução de polifenóis de chá, é provavelmente o composto mais responsável pela actividade antibacteriana do polifenóis do chá para *S. aureus*, uma vez que estudos anteriores sugeriram que o EGCG tem actividade bactericida (Navarro-Martinez *et al.*, 2005).

Outro estudo propôs a epigallocatequina galato como o principal componente antibacteriano de chá verde (Blanco *et al.*, 2005; Shiota *et al.*, 1999 citado por (Bakkir *et al.*, 2011), particularmente em combinação com outros agentes anti-microbianos (Zhao *et al.*, 2002; Bakkir *et al.*, 2011).

Tanto a (-)-epigallocatequina galato (EGCG) como a (-)-epicatequina galato (ECG), podem inibir o crescimento de uma vasta gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas com potência moderada (Taylor *et al.*, 2005). Concentrações relativamente baixas de ECG podem sensibilizar *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) provenientes de amostras clínicas para diferentes níveis de oxacilina. É provável que galatos de catequina como ECG intercalada entre bicamadas de fosfolípidos afetem tanto a virulência como a resistência a antibióticos através da perturbação da função dos processos-chave associadas à membrana citoplasmática bacteriana (Taylor *et al.*, 2005).

Outro estudo ainda (Kono *et al.*, 1994) mostrou que a EGCG apresentava actividade antibacteriana para cerca de 50 isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA). Este estudo verificou ainda que a actividade de EGCG era estável a várias condições físicas, incluindo a ferver ou de congelação. Estas verificações sugerem que a EGCG poderia ser um agente útil para o tratamento da infecção por MRSA.

O ácido tânico, galato de propilo e galato de metilo (ésteres do ácido gálico), mas não o ácido gálico, são inibidores para o crescimento de todas as bactérias intestinais testadas o que inclui *Escherichia coli*, excepto as bactérias do ácido láctico *L. acidophilus* e *Bifidobacterium infantis*. O ácido tânico tem um efeito inibidor mais forte do que o metil-galato ou o propil-galato (Chung *et al.*, 1998).

ECG e EGCG, mas não EC ou EGC, têm sido referidos como sendo antagonistas potentes do vírus da imunodeficiência humana de transcriptase reversa, provocando 50% de inibição a concentrações de 10 a 20 ng/ml (Nakane *et al.*, 1990 citado por Hamilton-Miller, 1995).

Ikigai e colaboradores (Ikigai *et al.*, 1993) mostraram também que a EC foi muito menos activa do que o EGCG.

Os flavonóis quercetina, campferol e miricetina apresentaram actividade para bactérias gram-positivas e fungos fitopatogênicos num teste de triagem (El-Gammal, & Mansour, 1986 citado por Hamilton-Miller, 1995). A quercitina teve uma MIC de 37 mg/ml para *S. aureus* e foi inativo para *E. coli*.

Um estudo realizado por Vaquero e colaboradores (Vaquero *et al.*, 2007) mostrou que o crescimento de *E. coli* foi inibido entre 5 e 1000 mg/l pelos ácidos gálico, vanílico e protocatecuico, atingindo a inibição máxima observada a 200 mg/l de ácido vanílico. O efeito inibitório do ácido cafeico foi observado de 1 a 500 mg/l, alcançando o seu efeito máximo aos 50 mg/l. Entre os compostos flavonoides, com uma concentração de 50 mg/l de rutina ou de quercetina, foi produzida uma actividade antimicrobiana moderada em *E. coli*. O mesmo efeito foi observado com 1000 mg/l de catequina, indicando que o microrganismo é mais tolerante a este flavonóide. Esse mesmo estudo mostrou ainda que o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi resistente a todos os ácidos fenólicos puros (ácidos gálico, vanílico protocatecuico e cafeico). O crescimento do *Staphylococcus aureus* foi inibido entre 2 e 1000 mg/l pela quercetina mas não apresentou qualquer inibição em relação à rutina (Vaquero *et al.*, 2007).

Um estudo (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001) relatou que diferentes espécies bacterianas (gram-positivas e gram-negativas) exibem diferentes sensibilidades em relação aos fenólicos. Mostrou ainda que os ácidos fenólicos, tais como cinâmico, cumárico, ferúlico e cafeico inibiram actividade antibacteriana em *E. coli* e *Salmonella enterica* em altas concentrações.

Os ácidos hidroxicinâmicos, devido à sua cadeia lateral, são muito menos polares do que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes. Campos e colaboradores (Campos *et al.*, 2003) relataram que, em *Oenococcus oeni*, esta propriedade pode facilitar o transporte destas moléculas através da membrana celular, o que pode ser, por sua vez, relacionado com o efeito inibidor mais forte de ácidos hidroxicinâmicos. Por outro lado, os derivados de ácidos hidroxicinâmicos são conhecidos por interagir com os lípidos da membrana das papilas gustativas da língua por uma neutralização, na membrana, do seu potencial eléctrico, após a penetração da molécula (Macheix *et al.*, 1990 citado por Vaquero *et al.*, 2007). Um efeito semelhante pode ocorrer na membrana da célula bacteriana, afectando o metabolismo de energia (Vaquero *et al.*, 2007).

Os ácidos fenólicos têm diferentes capacidades antioxidantes, ou seja, diferentes capacidades de sequestrar o radical oxigénio, as quais estão relacionadas com os substituintes do anel aromático (Natella *et al.*, 1999). Este efeito antioxidante é forte com um substituinte cinâmico, depois com ácidos benzóicos e é maior com substituintes dihidroxi (cafeico e protocatecuico) e p-hidroximetoxi (ferúlico e vanílico).

Entre os flavonóides testados, a quercetina flavonol, forma aglicona, foi mais eficaz do que a forma rutina glicosídica. Rauha e colaboradores (Rauha *et al.*, 2000) relataram que a quercetina inibiu o crescimento de todas as espécies estudadas (*Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli* e *Ps. aeruginosa*) e que a rutina era inactiva em todos eles. Os resultados deste estudo mostram que ambos os flavonóis foram inibitórios para determinados microorganismos: quercetina contra *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e a rutina para *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Por outro lado (Puupponen-Pimia *et al.*, 2001) os flavonóides catequina, quercetina e rutina não afectaram o crescimento de *E. coli*. No estudo de Vaquero e colaboradores (Vaquero *et al.*, 2007), a quercetina foi o inibidor mais forte, activo para nove das dez bactérias ensaiadas (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium sp.* e *Klebsiella pneumoniae*, de origem humana e *Escherichia coli* ATCC35218, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Os componentes menores em plantas contribuem como um factor sinérgico (Si *et al.*, 2006). Foi relatado que polifenóis de chá verde aumentam de forma sinérgica e prolongam o efeito de um outro componente do chá, a cafeína, noutras actividades biológicas (Dulloo *et al.*, 2000). Efeito sinérgico dos polifenóis sobre a actividade antioxidante foi também relatado noutros estudos (Tsao *et al.*, 2005).

4.4 – Conclusões

O rendimento de extracção dos compostos a partir das matrizes em estudo (chá verde “Encosta da Bruma”, EB, chá preto “Broken Leaf”, BL, e os resíduos aspirado, ASP, e varredura, VAR) foi dependente do solvente utilizado. O rendimento variou entre 31,22% no BL e 45,95% no EB com solução aquosa de acetona a 50%, entre 39,80% no ASP e 47,33% no BL com solução aquosa de etanol a 50% e de 40,95% na VAR e 47,35% no ASP com água. Estas variações indicam que a composição dos chás e dos resíduos não é a mesma, pois o rendimento de extracção é diferente entre matrizes para o mesmo solvente. A eficiência de extracção não é a mesma uma vez que para uma mesma matriz, utilizando solventes diferentes, a percentagem de extracção é diferente.

Em termos dos solventes testados observou-se a extracção preferencial de diferentes compostos com os diversos solventes, destacando-se a acetona a 50%, mas sendo também obtidas elevadas concentrações de alguns compostos individuais quando se utilizou etanol a 50%. A extracção sucessiva com estes dois solventes poderá ser uma forma de maximizar a extracção de compostos fenólicos a partir do chá ou dos seus resíduos.

A utilização destes resíduos, particularmente os provenientes da aspiração, apresenta a vantagem de se tratar de matrizes com uma granulometria muito baixa o que se traduziu em valores superiores quer da sua actividade antioxidante, quer dos teores de compostos individuais quando comparados com os extractos de chá obtidos em condições similares.

O conteúdo de fenólicos totais varia entre 49,9 mg/g de extracto seco no extracto aquoso de “Broken Leaf” e 232,1 mg/g de extracto seco no extracto de acetona (50%). No entanto, para cada um dos solventes utilizados, é no extracto de “Broken Leaf” que os teores são inferiores. Em relação às propriedades antioxidantes verifica-se também que os extractos obtidos a partir do chá preto “Broken Leaf” são aqueles que apresentam menores valores quer para a actividade antiradicalar, quer em relação ao poder redutor férrico. Este facto deve-se provavelmente à perda de conteúdo de compostos fenólicos, principalmente de catequinas, durante o processo de fermentação das folhas de chá durante a produção do chá preto.

Para os extractos de chá preto não foi detectada qualquer actividade antimicrobiológica, em relação aos microorganismos testados (*Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Candida albicans*), o que está relacionado com os compostos fenólicos dos extractos.

Os extractos do chá verde e dos resíduos, utilizando como solventes as soluções aquosas de acetona e de etanol (50%), são aqueles que apresentam maiores teores de fenólicos totais, maior actividade antiradicalar, maior poder redutor férrico e maior actividade antimicrobiana. Tal facto está possivelmente ligado à maior concentração de compostos fenólicos nos respectivos extractos, nomeadamente um maior teor de catequinas.

Constata-se assim que as catequinas são efectivamente componentes funcionais muito importantes nos extractos de chá no que respeita à sua actividade biológica, mas a presença de outros compostos fenólicos, nomeadamente flavonóis e seus derivados, dão também um contributo importante para estas propriedades.

Conforme referido anteriormente verificou-se que foram os extractos de solventes a 50% os que continham quantidades mais elevadas de polifenóis, em comparação com os seus correspondentes puros, depois de 24 h de extracção. Apesar de se ter optado por não prosseguir o estudo com os solventes puros de acetona e de etanol, este facto pode ser verificado quando se compara os resultados obtidos entre as soluções aquosas de acetona e de etanol (50%) com o solvente água para a maioria dos parâmetros determinados neste estudo.

As folhas velhas de chá que são muitas vezes consideradas como resíduos agrícolas, e os resíduos provenientes de fábricas de chá, como os resíduos Aspirado e Varredura provenientes da Fábrica da Gorreana, contêm compostos que possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas que podem ser extraídos e adicionados aos alimentos, a produtos medicinais farmacológicos ou mesmo a produtos cosméticos. No entanto, o teor total de polifenóis e as actividades antioxidante e antimicrobianas podem ser significativamente afectados pelo uso de solventes com polaridades diferentes. Existe no entanto uma alta correlação entre o teor de polifenóis e as actividades antioxidante e antimicrobianas verificadas nos vários extractos.

A utilização de extractos de chá, em combinação com outros aditivos ou métodos antimicrobianos, para estabilizar produtos alimentares pode representar uma forma alternativa de manter a qualidade dos alimentos, sem o uso dos conservantes convencionais.

A actividade antimicrobiana demonstrada pelos extractos de chá é, provavelmente, devida, principalmente à epigallocatequina-3-galato. As contribuições de outras moléculas estão limitados pelo facto de as suas concentrações serem pequenas, no entanto, estes componentes podem contribuir para a actividade como um factor sinérgico.

Capítulo 5 - Conclusões

A planta *Camellia sinensis* tem sido amplamente estudada, como alimento funcional, devido ao seu conteúdo específico de flavonoides, que lhe confere inúmeras propriedades terapêuticas e potencial capacidade de promover benefícios de saúde.

O chá é uma bebida agradável, popular, socialmente aceite, económica e segura, a qual é apreciada por centenas de milhões de pessoas em todos os continentes, sendo uma fonte dietética de compostos biologicamente activos que podem prevenir uma grande variedade de doenças (Khan *et al*, 2007). Assim, o consumo de infusões de plantas para prevenção e tratamento de perturbações da saúde é uma prática em todo o mundo..

Portugal é o único país europeu que produz chá verde e preto, com uma produção estimada em 125 toneladas no ano de 2007, proveniente do arquipélago dos Açores, das indústrias *Fábrica de Chás Gorreana* e *Fábrica de Chá Porto Formoso*. As propriedades nutricionais e organolépticas destes chás foram apenas pontualmente abordadas em trabalhos de investigação, havendo necessidade de efectuar um trabalho mais completo e pormenorizado, de forma a caracterizar estes chás e compará-los com produtos análogos comercializados em Portugal.

Vários estudos têm demonstrado que, as variações no teor de polifenóis e de minerais nos chás comerciais são o resultado de um grande número de factores, nomeadamente, composição dos solos, clima, a variedade da planta *Camellia sinensis*, a composição e a idade da cultura, a transformação industrial (fermentação e moagem) e o armazenamento. Estas diferenças são mantidas e mesmo acentuadas pelo processo de infusão. A temperatura da água e do tempo de infusão são condições cruciais que determinam o teor de polifenóis e, como consequência, a capacidade antioxidante das infusões dos chás. O conteúdo fenólico é também influenciado pelo tipo de água utilizado, pelo uso de folhas soltas ou de chá ensacado (doses individuais) ou chá em pó, pela quantidade de chá em relação à quantidade de água.

Neste trabalho estudou-se a composição e actividade antioxidante de chás verdes, chás pretos, chás vermelhos e tisanas de ervas.

Foram seleccionados os chás *Gorreana* nas suas diferentes variedades (verde: folhas enroladas, Encosta da Bruma e Hysson, e preto: Orange Pekoe, Pekoe, Broken Leaf e Moinha), outro chá preto açoreano (*Porto Formoso* na variedade Pekoe), num total de oito chás com origem nos Açores, e diferentes chás importados com origens diversas e disponíveis no mercado português (três chás verdes, chá verde com ginseng, chá verde e menta, quatro chás pretos, chá preto com limão, chá preto com canela e laranja), num total de onze, três chás vermelhos e chá vermelho com laranja; foram ainda incluídas neste estudo seis tisanas de ervas tradicionalmente consumidas em Portugal, nomeadamente tília, cidreira, menta, lúcia-lima e camomila.

Os chás verdes e pretos incluídos neste trabalho foram agrupados em função do tipo de chá, presença de aditivos e origem geográfica, e os diferentes grupos homogéneos foram comparados entre si quanto às variáveis em estudo.

Foram ainda utilizados alguns dos resíduos da Fábrica Gorreana, tendo em vista a sua valorização e utilização como matéria-prima para a produção de suplementos nutracêuticos, quer para produtos alimentares, quer para produtos cosméticos, quer para os produtos farmacêuticos.

A composição mineral das folhas de chá e das correspondentes infusões de 5 e 15 minutos foi avaliada no que se refere aos macroelementos (K, Ca, Mg e Na) com valor nutricional e ao alumínio (Al), tendo-se verificado que as suas concentrações dependem do tipo de chá e do tempo de infusão.

Foi feita ainda a caracterização das folhas de chá (verdes e pretos) quanto aos teores de humidade, de cinzas, de fenólicos totais, de fósforo e de azoto.

Devido ao solo apresentar diferentes biodisponibilidades dos elementos, as folhas de chás podem variar fortemente as suas concentrações de minerais, azoto e fósforo.

A maior parte dos solos nos Açores, fruto da sua origem vulcânica, são Andossolos. Os andossolos possuem uma grande capacidade de retenção de fósforo e água, por serem muito porosos, pelo que as plantas que nele crescem têm normalmente falta desse nutriente. São solos com um pH moderadamente ácido, com muita boa permeabilidade, elevado nível de matéria orgânica, geralmente ricos em potássio, dada a predominância de rochas basálticas, e enriquecidas em azoto, dada a frequência das siderações (Pacheco, 2005).

A influência do clima dos Açores manifesta-se sobre o volume e qualidade da colheita (Pacheco, 2005). Mesmo sem haver uma estação seca bem marcada a época de colheita, de Abril a Setembro, coincide com os meses com menor pluviosidade, o que leva a um crescimento lento do rebento, sinónimo de colheitas de maior qualidade.

Em São Miguel as plantas emitem rebentação nova a partir de Abril, altura em que se inicia a época de colheita. De Outubro a Março a rebentação cessa ou reduz drasticamente e não compensa economicamente proceder à colheita. Esta fase de crescimento vegetativo limita o desenvolvimento desta cultura agro-industrial, com carácter marcadamente sazonal.

O teor de humidade dos chás verdes e pretos variou entre 6,9% e 11,7%, no entanto, foram os chás dos Açores que apresentaram menores teores. O teor de humidade é um parâmetro de qualidade importante em alimentos desidratados como é o caso do chá pois condiciona a sua duração em prateleira, à temperatura ambiente.

O teor de cinzas do chá em folha reflecte a sua composição mineral mas também pode ser encarado como um parâmetro de qualidade do seu processamento pois valores muito elevados do teor de cinzas podem corresponder a contaminações com pós, areias ou outros materiais inorgânicos. Os chás analisados apresentam teores de cinzas 4,98% m/m e 6,96%, teores estes que não apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Não foram ainda reveladas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as várias categorias de chá (verde Açores, verde comercial, verde comercial adicionado, preto Açores, preto comercial, preto comercial adicionados) no que respeita aos teores de sódio e de potássio, no entanto, os chás dos Açores apresentam teores superiores a todos os outros grupos considerados tendo em atenção o tipo de chá (verde ou preto), excepto o teor de sódio nas folhas de chá verde. Os chás dos Açores apresentam ainda os maiores teores magnésio, os menores teores de alumínio e intermédios de cálcio, considerando o mesmo tipo de chá (verde ou preto).

Os chás dos Açores apresentam teores mais baixos de alumínio, o que é uma vantagem para os chás dos Açores, uma vez que tem sido observado que a doença de Alzheimer aparece associada à presença deste metal (Al) (Karak, 2010)

Embora os tempos de infusão recomendados variem entre 30 segundos a 10 minutos, tradicionalmente, alguns destes chás são fervidos como é o caso dos chás preparados na Índia e no Paquistão (Rehman *et al*, 2002; Olivier *et al*, 2012).

Quando as folhas são utilizadas para a preparação de chá, apenas o componente de elementos extraível está disponível para os seres humanos.

A partir de todas as amostras de chás verdes e pretos foram preparadas infusões em proporções idênticas à sua utilização alimentar com tempos de infusão de 5 min, 15 min e 30 minutos. Deve notar-se que as diferenças de tempo de infusão afectam a biodisponibilidade de minerais, conforme já foi referido anteriormente.

As propriedades funcionais destas infusões foram determinadas através de testes das suas actividades antioxidantes. Verifica-se que o teor de fenólicos totais, determinado pelo teste de Folin-Ciocalteu, aumentou com o tempo de infusão embora a velocidade de extracção tenha diminuído. Verificou-se, ainda, que os chás verdes têm teores superiores aos chás pretos correspondentes. Observou-se ainda que os chás dos Açores (verdes e pretos) apresentam, para cada um dos tipos de chá e para cada um dos tempos de infusão, os teores mais baixos de fenólicos totais, no entanto, essas diferenças diminuem em função do tempo. Este facto mostra que, à medida que o tempo de infusão aumenta, as diferenças de granulometria das folhas de chá perdem importância.

Em relação à actividade anti-radicalar (DPPH) e o poder redutor férrico (FRAP), estas actividades são superiores nos chás verdes que nos chás pretos, e aumentam até aos 15 minutos e entre os 15 e 30 minutos, diminuem. Indica que os compostos responsáveis por estes tipos de actividades podem ser fenólicos que se degradam com o tempo de infusão, reagem entre eles ou existem equilíbrios que são atingidos havendo diminuição da concentração dos compostos responsáveis por estas actividades nas infusões.

Os macromelementos, nomeadamente, Mg, Ca, Na, K e Al, determinados para os chás verdes e pretos nas infusões de 5 e 15 minutos mostraram que só uma pequena fracção é extraída das folhas e passa para a bebida chá, no entanto, e como era esperado, essa concentração aumenta com o tempo de infusão. Os dados obtidos sugerem que os chás dos Açores têm, de uma forma geral, teores inferiores aos outros chás do mesmo tipo (verdes ou pretos). Tal facto pode ter como origem a diferente granulometria das folhas de chá utilizadas para os diferentes chás. Por opção foram utilizados os chás de acordo com a sua disponibilidade no mercado.

Não foram reveladas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as várias categorias de chá (verde Açores, verde comercial, verde comercial adicionado, preto Açores, preto comercial, preto comercial adicionados) quanto a alguns parâmetros: zinco, alumínio, cobre e sódio (infusões de 5 minutos); peso seco, ferro, zinco, alumínio, cobre e sódio (infusões de 15 minutos).

Em relação aos extractos aquosos, infusões preparadas com uma hora de fervura das folhas de chá, verifica-se que não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos sólidos totais e fenólicos totais.

Os resultados obtidos nesta investigação sugerem que eficiência máxima de extracção de compostos bioactivos estudados de chá verde é obtida durante a extracção aquosa com água fervente durante 15 minutos. A capacidade antioxidante de todos os chás ensaiados está correlacionada com o teor total de fenóis, o qual depende das condições de extracção (tempo de extracção e granulometria das folhas de chá).

Com este trabalho foi observado que existem diferenças significativas na composição química de chás verdes e pretos comercialmente disponíveis. Os resultados mostraram ainda que os chás, especialmente os chás verdes, são uma fonte rica de compostos bioactivos (polifenóis e metilxantinas) e de minerais. A eficiência da extracção destes compostos depende fortemente das condições de extracção, nomeadamente, o tempo de infusão, a granulometria das folhas de chá e solvente utilizado. As actividades biológicas variaram também de acordo com os testes específicos (o teor de fenólicos

(reacção de Folin-Ciocalteu), a actividade antiradicalar (DPPH) e actividade redutora férrica (FRAP)). Estas variações indiciam diferentes cinéticas de extracção e degradação de compostos específicos

Por análise HPLC-DAD, nas infusões de 15 minutos, foram determinados e quantificados os principais compostos polifenólicos bioactivos nos chás verdes, determinados a 280 nm, que são as catequinas, com 61% e as metilxantinas, com 22%, sendo o composto que apresenta maior teor a epigallocatequina-3-galato, seguido da cafeína, da epigallocatequina e da epicatequina. Nos chás pretos os compostos bioactivos com maior concentração são as metilxantinas, com 42%, estando presente com um teor mais elevado a cafeína.

Verificou-se que os compostos de catequina, especialmente EGCG, contribuiu muito para a actividade antioxidante do chá, e que esta diminuiu durante a fermentação de chá e levou à redução da actividade antioxidante.

No caso da concentração da cafeína, a análise estatística foi afectada negativamente pelo chá preto com canela e laranja que distorceu os resultados referentes aos chás pretos comerciais, uma vez que apresenta um teor muito baixo.

Nos extractos aquosos existiu uma perda de conteúdo polifenólico em relação às infusões de 15 minutos correspondentes. Este facto deveu-se possivelmente a uma conjugação de processos como a degradação dos compostos por quebra de ligações levando à formação de compostos mais simples, como é o caso, por exemplo, das degradação das catequinas e dos flavonóides glicosilados; a isomerização das catequinas; a oxidação e polimerização das catequinas e teoflavinas; complexação com iões metálicos; quer por formação da nata do chá, conforme foi referido anteriormente.

Os compostos flavonóides solúveis até agora identificados nos chás dos Açores foram os compostos maioritários as catequinas, nomeadamente, galocatequina, epicatequina, epigallocatequina-3-galato, epicatequina-3-galato. Além destes compostos já foram também identificados ácido gálico, cafeína e teofilina, e o ácido p-cumaroilquinico.

Os compostos nos chás dos Açores que, até ao momento, não tinham sido identificados e que o foram neste trabalho foram os seguintes: ácido 5-galoilquinico, teobromina, ácido hidroxicinâmico e três isómeros do ácido cumárico (B2, B3 e B7), dois isómeros do ácido clorogénico (B4 e B13), ácido clorogénico (B5), três flavonas glicosiladas (B8, B9 e B10) e cinco flavonóis glicosilados acilados (B11, B12, B15, B16 e B17), dois flavonóis glicosilados (C1 e C2), dois derivados da quercitina glicosilados (C3 e C4) e três derivados do capferol glicosilados (C5, C6 e C7).

A valorização de resíduos dos chás *Gorreana* como matérias-primas para a produção de suplementos nutracêuticos foi estudada. A partir de duas amostras de chás (verde: Encosta da Bruma e preto: Broken Leaf) bem como de dois resíduos produzidos na Fábrica de Chá Gorreana (Aspirado e Varredura), foram preparados extractos bioactivos utilizando solventes orgânicos adequados à solubilização de compostos fenólicos e/ou óleos vegetais, nomeadamente, água, etanol e acetona puros e soluções aquosas (50%). Os resultados mostraram que a polaridade do solvente afectou significativamente o teor de polifenóis, actividade antioxidante e actividade antimicrobiana dos extractos.

A actividade antimicrobiana de chá não fermentado, chá verde, é mais elevada do que a de chá fermentado, chá preto. A maior actividade antimicrobiana ocorre nas amostras com maior concentração de polifenóis totais e actividade antioxidante. A sensibilidade das bactérias aos polifenóis depende da espécie bacteriana (gram-positiva e gram-negativa) e da estrutura de polifenol. Assim verificou-se que os extractos de chá verde inibiram o crescimento de bactérias gram-positivas

(*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina), e observou-se uma correlação forte entre teor de polifenóis e as actividades antioxidante e antimicrobiana de extractos de chá.

Chás verdes e alguns resíduos, como aspirado, varredura ou mesmo folhas velhas, são as melhores fontes de extractos que podem agir como inibidores microbiológicos. A utilização destes chás em combinação com outros aditivos ou métodos antimicrobianos para estabilizar produtos alimentares representa uma maneira alternativa de manter uma elevada qualidade de sabor e aspecto, sem o uso de conservantes de alimentos convencionais.

A composição da água desempenha um papel importante na extracção química de folhas de chá e consequentemente na composição da infusão de chá. No presente estudo, as infusões de chá foram preparadas usando água destilada. No entanto, o chá para os consumidores será preparado com água a partir de várias fontes e, portanto, contendo diferentes concentrações elementares o que pode afectar as concentrações elementares da infusão de chá.

Além disso, a variação do volume de chá preparado tem efeitos sobre a concentração. Aumentando-se o volume de preparação da infusão sem alteração da razão chá: água, aumenta-se a eficiência da extracção dos compostos bioactivos, este facto é devido a que o arrefecimento de volumes maiores é mais demorado que o arrefecimento de volumes menores (Nishiyama *et al*, 2010).

O chá é a bebida mais popular do mundo, ao lado de água e, portanto, pode ser reconhecido como uma parte importante de uma dieta. No entanto, existem evidências que a ingestão oral de diferentes compostos fenólicos antioxidantes, minerais e elementos vestigiais podem ter lugar a partir de chá.

A toxicidade dos oligoelementos que podem ser fixados pela planta *Camellia sinensis*, tais como por exemplo o Ni, Cr, Pb, não quantificados neste trabalho, depende não só da quantidade total de metal, mas também nas espécies existentes. Portanto, a determinação total do elemento não é adequado para avaliação de risco.

Bibliografia

- Aguiar, C.L. (2002) Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. *B.CEPPA*, 20 (2), pp.323-334.
- Aherne, S.A.; O'Brien, N.M. (2002) Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutrition*, 18 (1), pp. 75-81.
- Akande, I.S.; Samuel, T.A.; Agbazue, U.; Olowolagba, B.L. (2011) Comparative Proximate Analysis of Ethanolic and Water Extracts of *Cymbopogon citratus* (Lemon grass) and Four Tea Brands. *Plant Sciences Research*, 3 (4), pp. 29-35.
- Akowuah, G.A.; Ismail, Z.; Norhayati, I.; Sadikun, A. (2005) The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity). *Food Chemistry*, 93, pp. 311-317.
- Almajano, M.P.; Carbó, R.; Jiménez, J.A.L.; Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108, pp. 55-63.
- Almeida, M.D.V. & Afonso, C.I.P.N. (1997) Princípios básicos de alimentação e nutrição. Universidade Aberta, Lisboa.
- Al-Oud, S.S. (2003) Heavy Metal Contents in Tea and Herb Leaves. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6 (3), pp. 208-212.
- Alzoreky, N.S.; Nakahara, K. (2003) Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology* 80, pp. 223– 230.
- Ananingsih, V.K.; Sharma, A.; Zhou, W. (2013) Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Research International*, 50, pp. 469-479.
- Andersen, Ø. M.; Markham, K.R. (2006) Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications. *CRC Press, Taylor & Francis Group*, pp. 1-1197.
- Angelo, P.M. & Jorge, N. (2007) Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão, *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 66 (1), pp. 1-9.
- Ansari, F.; Norbaksh, R.; Daneshmandirani, K. (2007) Determination of heavy metals in Iranian and imported black tea. *Iranian Journal of Environmental Health Science Engineering*, 4 (4), pp. 243-248.
- Anunciato, T.P.; Filho, P.A.daR. (2012) Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 11 (1), pp. 51-54.
- Archana, S.; Abraham, J. (2011) Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (08), pp. 149-152.
- Arent, S. M.; Senso, M.; Golem, D.L.; McKeever, K.H. (2010) The effects of theaflavin-enriched black tea extract on muscle soreness, oxidative stress, inflammation, and endocrine responses to acute anaerobic interval training: a randomized, double-blind, crossover study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 7 (11), pp.1-10.
- Ashish, M.; Vinay, J.; Jain, A.; Jat, R.C.; Sudhir, B.; Jain, S.; Subodh, D. (2010) Antianxiety activity of leaves of *Camellia sinensis*. *Journal of Pharmacy Research*, 3 (3), pp. 605-607.
- Asif, M.; Khodadadi, E. (2013) Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. *Journal of Paramedical Sciences*, 4 (3), pp. 119-138.
- Atoui, A.K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. (2005) Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, pp. 27-36.
- Azmir, J.; Zaidul, I.S.M.; Rahman, M.M.; Sharif, K.M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M.H.A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N.A.N.; Omar, A.K.M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), pp. 426-436.

- Bahorun, T.; Luximon-Ramma, A.; Neergheen-Bhujun, V.S.; Gunness, T.K.; Googoolye, K.; Auger, C.; Crozier, A.; Aruoma, O.I. (2012) The effect of black tea on risk factors of cardiovascular disease in a normal population. *Preventive Medicine*, 54, pp. S98-S102.
- Bakkir, L.K.; Yassen, R.T.; Mustaffa, R.M. (2011) In Vitro and Vivo Study of Green and Black Tea Antimicrobial Activity on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 10 (2), pp. 1-12.
- Balentine, D. A.; Wiseman, S. A.; Bouwens, L.C.M. (1997) The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(8), pp. 693-704.
- Bancirova, M. (2010) Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43, pp. 1379-1382.
- Baptista, J.; Lima, E.; Paiva, L.; Andrade, A.L.; Alves, M.G. (2012) Comparison of Azorean tea theanine to teas from other origins by HPLC/DAD/FD. Effect of fermentation, drying temperature, drying time and shoot maturity. *Food Chemistry*, 132, pp. 2181-2187.
- Baptista, J.A.B.; Tavares, J.F.P.; Carvalho, R.C.B. (1998) Comparison of catechins and aromas among different green teas using HPLC/SPME-GC. *Food Research International*, 31 (10), pp. 729-736.
- Baptista, J.A.B.; Tavares, J.F.P.; Carvalho, R.C.B. (1999) Comparative Study and Partial Characterization of Azorean Green Tea Polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12 (4), pp. 273-287.
- Bastianetto, S.; Quirion, R. (2004) Natural antioxidants and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Bioscience*, 9, pp. 3447-3452.
- Batista, G.A.P.; Cunha C.L.P.; Scartezini, M.; von der Heyde R.; Bitencourt, M.G.; Melo, S.F. (2009) Estudo Prospectivo, Duplo Cego e Cruzado da *Camellia sinensis* (Chá Verde) nas Dislipidemias. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 93 (2), pp. 128-134.
- Baydar, N.G.; Ozkan, G.; Sagdiç, O. (2004) Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15, pp. 335-339.
- Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, pp. 70-76.
- Blanco, A.R.; Sudano-Roccaro, A.; Spoto, G.C.; Nostro, A.; Rusciano, D. (2005) Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Formation by Ocular Staphylococcal Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (10), pp. 4339-4343.
- Bonoli, M.; Pelillo, M.; Toschi, T.G.; Lercker, G. (2003) Analysis of green tea catechins: comparative study between HPLC and HPCE. *Food Chemistry*, 81, pp. 631-638.
- Borges, L.L., da Conceição, E.C., Silveira, D. (2013) Active Compounds and Medicinal Properties of *Myrciaria* Genus, *Food Chemistry*, pp.1- 43.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, pp. 25-30.
- Bravo, M.N.; Silva, S.; Coelho, A.V.; Boas, L.V.; Bronze, M.R. (2006) Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. *Analytica Chimica Acta*, 563, pp. 84-92.
- Brighente, I.M.C.; Dias, M.; Verdi, L.G.; Pizzolatti, M.G. (2007) Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, 45 (2), pp. 156-161.
- Buchner, N.; Krumbein, A.; Rohn, S.; Kroh, L.W. (2006) Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, pp. 3229-3235.
- Buratti, S.; Casiraghi, A.; Minghetti, P.; Giovanelli, G. (2013) The Joint Use of Electronic Nose and Electronic Tongue for the Evaluation of the Sensorial Properties of Green and Black Tea Infusions as Related to Their Chemical Composition. *Food and Nutrition Sciences*, 4, pp. 605-615.
- Burda, S.; Oleszek, W. (2001) Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 2774-2779.

- Cabido, A.G.F. (1913) *A Indústria do chá nos Açores*. Boletim do Trabalho Industrial, nº 88. Coimbra, Imprensa da Universidade.
- Cabrera, C.; Artacho, R.; Giménez, R. (2006) Beneficial effects of green tea- a review. *Journal of American College of Nutrition* 25 (2), pp. 79-99.
- Cabrera, C.; Nez, R.G.; Pez, M.C. (2003) Determination of Tea Components with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 4427-4435.
- Callegari-Jacques, S.M. (2003) *Bioestatística: princípios e aplicações*. Artemed (Ed.), Porto Alegre, p.255 (ISBN: 978 85 363 1144 9).
- Campos, F.M.; Couto, J.A.; Hogg, T.A. (2003) Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 94, pp. 167-174.
- Cardoso, L.M.; Leite, J.P.V.; Gouveia, M. do C. (2011) Peluzio Efeitos biológicos das antocianinas no processo aterosclerótico. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, Vol. 40 (1), pp. 116-138.
- Carloni, P.; Tiano, L.; Padella, L.; Bacchetti, T.; Customu, C.; Kay, A.; Damiani, E. (2013) Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Research International* 53, pp. 900-908.
- Catterall, F.; Copeland, E.; Clifford, M.N.; Ioannides, C. (1998) Contribution of theafulvins to the antimutagenicity of black tea: their mechanism of action. *Mutagenesis*, 13 (6), pp. 631-636.
- Cerqueira, F. M.; Medeiros, M.H.G de; Augusto, O. (2007) Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim. Nova*, 30 (2), pp. 441-449.
- Chan, E.; Ying-Kat, C.W.; Wan, C-W.; Kwok, C-Y.; Wu, J-H.; Ng, K-M.; So, C-H.; Au, A. L-S.; Poon, C. C-W.; Seto, S-W.; Kwan, Y-W.; Yu, P. H-F.; Chan, S-W. (2010) Evaluation of Anti-Oxidant Capacity of Root of *Scutellaria baicalensis* Georgi, in Comparison with Roots of *Polygonum multiflorum* Thumb and *Panax ginseng* CA Meyer. *The American Journal of Chinese Medicine*, 38 (4), pp. 815-827.
- Chan, E.W.C.; Lim, Y.Y.; Chew, Y.L. (2007) Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, 102, pp. 1214-1222.
- Chan, E.W.C.; Lim, Y.Y.; Chong, K.L.; Tan, J.B.L.; Wong, S.K. (2010) Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, pp. 185-189.
- Chanchal, D.; Pharm, M.; Swarnlata, S.; Pharm, M. (2008) Novel approaches in herbal cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7, pp. 89-95.
- Chang, L-K.; Wei, T-T.; Chiu, Y-F.; Tung, C-P.; Chuang, J-Y.; Hung, S-K.; Ching Li; Liu, S-T. (2003) Inhibition of Epstein-Barr virus lytic cycle by (-) -epigallocatechin gallate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301, pp. 1062-1068.
- Chaturvedula, V.S.P.; Prakash, I. (2011) The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (11), pp. 2110-2124.
- Chavan, U.D.; Shahidi, F.; Naczki, M. (2001) Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75, pp. 509-512.
- Chen, C-Y.O.; Ribaya-Mercado, J.D.; McKay, D.L.; Croom, E.; Blumberg, J.B. (2010) Differential antioxidant and quinone reductase inducing activity of American, Asian, and Siberian ginseng. *Food Chemistry*, 119, pp. 445-451.
- Chen, H.; Zhang, M.; Qu, Z.; Xie, B. (2008) Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 106, pp. 559-563.
- Chen, Q.; Guo, Z.; Zhao, J. (2008) Identification of green tea's (*Camellia sinensis* (L.)) quality level according to measurement of main catechins and caffeine contents by HPLC and support vector classification pattern recognition. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, pp. 1321-1325.

- Chen, Q.; Zhao, J.; Guo, Z.; Wang, X. (2010) Determination of caffeine content and main catechins contents in green tea (*Camellia sinensis* L.) using taste sensor technique and multivariate calibration. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, pp. 353-358.
- Chen, W.; Sudji, I.R.; Wang, E.; Joubert, E.; van Wyk, B.E. & Wink, M. (2013) Ameliorative effect of aspalathin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on acute oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine*, 20 (3), pp. 380-386.
- Chen, Y.; Jiang, Y.; Duan, J.; Shi, J.; Xue, S.; Kakuda, Y. (2010) Variation in catechin contents in relation to quality of 'Huang Zhi Xiang' Oolong tea (*Camellia sinensis*) at various growing altitudes and seasons. *Food Chemistry*, 119, pp. 648-652.
- Chen, Z-Y.; Zhu, Q.Y.; Tsang, D.; Huang, Y. (2001) Degradation of Green Tea Catechins in Tea Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 477-482.
- Cheong, W. J.; Park, M.H.; Kang, G.W.; Ko, J.H.; Seo, Y. J. (2005) Determination of Catechin Compounds in Korean Green Tea Infusions under Various Extraction Conditions by High Performance Liquid Chromatography. *Bull. Korean Chem. Soc.* 26, (5), pp. 747 – 754.
- Cho, Y.S.; Schiller, N.L.; Kahng, H.Y.; Oh, K.H. (2007) Cellular Responses and Proteomic Analysis of *Escherichia coli* Exposed to Green Tea Polyphenols, *Current Microbiology*, 55, pp. 501-506.
- Cho, Y-S.; Oh, J.J.; Oh, K-H. (2010) Antimicrobial Activity and Biofilm Formation Inhibition of Green Tea Polyphenols on Human Teeth. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, pp. 359-364.
- Cho, Y-S.; Schiller, N.L.; Oh, K-H. (2008) Antibacterial Effects of Green Tea Polyphenols on Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, 57, pp. 542-546.
- Choi, Y.B.; Kim, Y.I.; Lee, K.S.; Kim, B.S.; Kim, D.J. (2004) Protective effect of epigallocatechin gallate on brain damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research*, 1019, pp. 47-54.
- Chou, C-C.; Lin, L-L.; Chung, K-T. (1999) Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal of Food Microbiology*, 48, pp. 125-130.
- Choung, M-G.; Hwang, Y-S.; Lee, M-S.; Lee, J.; Kang, S-T.; Jun, T-H. (2014) Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, pp. 1572-1578.
- Chung, K-T.; Lu, Z.; Chou, M.W. (1998) Mechanism of Inhibition of Tannic Acid and Related Compounds on the Growth of Intestinal Bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 36, pp. 1053-1060.
- Chung, K-T.; Wong, T.Y.; Wei, C-I.; Huang, Y-W.; Lin, Y. (1998) Tannins and Human Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (6), pp. 421-464.
- Cicco, N.; Lanorte, M.T.; Paraggio, M.; Viggiano, M.; Lattanzio, V. (2009) A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91, pp. 107-110.
- Cicco, N.; Lattanzio, V. (2011) The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin–Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, pp. 840-848.
- Costa, A.S.G.; Nunes, M.A.; Almeida, I.M.C.; Carvalho, M.R.; Barroso, M.F.; Alves, R.C. (2012) Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds. *LWT - Food Science and Technology* 49 (2012) 324-328.

- Crespy, V.; Williamson, G. (2004) A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins in In Vivo Animal Models. *The Journal of Nutrition*, 134 (12), pp. 3431S-3440S.
- Crozier, A.; Lean, M.E.J.; McDonald, M.S.; Black, C. (1997) Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 590-595.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, pp. 343-356.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. (2006) Errata for “Antimicrobial activity of flavonoids” [*International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (2005) pp. 343–356]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, pp. 181.
- D’Amelio, N.; Fontanive, L.; Uggeri, F.; Suggi-Liverani, F.; Navarini, L. (2009) NMR Reinvestigation of the Caffeine-Chlorogenate Complex in Aqueous Solution and in Coffee Brews. *Food Biophysics*, 4, pp. 321-330.
- Dalluge, J.J.; Nelson, B.C. (2000) Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*, 881, pp. 411-424.
- Dalluge, J.J.; Nelson, B.C.; Thomas, J.B.; Sander, L.C. (1998) Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 793, pp. 265-274.
- Dambiec, M.; Polechonska, L.; Klink, A. (2013) Levels of essential and non-essential elements in black teas commercialized in Poland and their transfer to tea infusion. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, pp. 62-66.
- Danrong, Z.; Yuqiong, C.; Dejiang, N. (2009) Effect of water quality on the nutritional components and antioxidant activity of green tea extracts. *Food Chemistry*, 113, pp. 110-114.
- Del Rio, D.; Stewart, A.J.; Mullen, W.; Burns, J.; Lean, M.E.J.; Brighenti, F.; Crozier, A. (2004) HPLC-MSn Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green and Black Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 2807-2815.
- Demirezen, D.; Aksoy, A. (2006) Heavy metal levels in vegetables in Turkey are within safe limits for Cu, Zn, Ni and exceeded for Cd and Pb. *Journal of Food Quality*, 29, pp. 252-265.
- Dhuique-Mayer, C.; Tbatou, M.; Carail, M.; Caris-Veyrat, C.; Dornier, M.; Amiot, M.J. (2007) Thermal Degradation of Antioxidant Micronutrients in Citrus Juice: Kinetics and Newly Formed Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 4209-4216.
- Dias, T.A.; Duarte, C.L.; Lima, C.F.; Proença, M.F.; Pereira-Wilson, C. (2013) Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. *European Journal of Medicinal Chemistry* 65, pp. 500-510.
- Ditre, C.M.; Rendon, M.I.; Rigel, D. (2008) Natural Approaches to Management of Photoaging. *Seminars Cutaneous Medicine and Surgery*, 27 (3), pp. 11-15.
- Domingo, D.S.; Camouse, M.M.; Hsia, A.H.; Matsui, M.; Maes, D.; Ward, N.L.; Cooper, K.D.; Baron-Int, E.D. (2010) Anti-angiogenic effects of epigallocatechin-3-gallate in human skin. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3 (7), pp. 705-709.
- Dou, J.; Lee, V.S.Y.; Tzen, J.T.C.; Lee, M-R. (2007) Identification and Comparison of Phenolic Compounds in the Preparation of Oolong Tea Manufactured by Semifermentation and Drying Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 7462-7468.
- Druzynska, B.; Stepniewska, A.; Wołosiak, R. (2007) The Influence of Time and Type of Solvent on Efficiency of The Extraction of Polyphenols from Green Tea and Antioxidant Properties Obtained Extracts. *Acta Scientiarum Polonorum/Technologia Alimentaria*, 6 (1), pp. 27-36.
- Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, M.; M’Erillon, J-M. (2009) Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest

- Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp. 1768-1774.
- Dufresne, C.J.; Farnworth, E.R. (2001) A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, pp. 404-421.
- Dulloo, A.G.; Seydoux, J.; Chantre, G.L.P.; Vandermader, J. (2000) Green tea and thermogenesis: interactions between catechinpolyphenols, caffeine and sympathetic activity. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders*, 24 (2), pp. 252-8.
- Dutra, A. de S.; Furtado, A.A.L.; Pacheco, S.; Neto, J.O. (2012) Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenóides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. *Brazilian Journal of Food Technology*. 15(3), pp. 198-207.
- Elmets, C.A.; Singh, D.; Tubesing, K.; Matsui, M.; Katiyar, S.; Mukhtar, H. (2001) Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 44, pp. 425-432.
- El-Seedi, H.R.; Asmaa M. A.; El-Said, A.M.A.; Khalifa, S.A.M.; Göransson, U.; Bohlin, L.; Borg-Karlson, A-K.; Verpoorte, R. (2012) Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *J. Agric. Food Chem.* 60, pp. 10877–10895.
- El-Shahawi, M.S.; Hamza, A.; Bahaffi, S.O.; Al-Sibaai, A.A.; Abduljabbar, T.N. (2012) Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry* 134, pp. 2268–2275.
- Emer, J.; Waldorf, H.; Berson, D. (2011). Botanicals and Anti-Inflammatories: Natural Ingredients for Rosacea. *Seminars Cutaneous Medicine and Surgery*, 30, pp. 148-155.
- Engelhardt, U.H.; Finger, A.; Kuhr, S. (1993) Determination of flavone C-glycosides in tea. *Z Lebensm Unters Forsch* 197, pp. 239-244.
- Erol, N.T.; Sarı, F.; Velioglu, Y.S. (2010) Polyphenols, Alkaloids and Antioxidant Activity of Different Grades Turkish Black Tea. *GIDA*, 35 (3), pp. 161-168.
- Escarpa, A. & González, M.C. (2001) Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427, pp. 119-127.
- Esfandiari, A.; Kelly, A.P. (2005) The Effects of Tea Polyphenolic Compounds on Hair Loss among Rodents. *Journal of the National Medical Association*, 97, (8), pp. 1165-1169.
- Farhoosh, R.; Golmohammadi, G.A.; Khodaparast, M.H.H. (2007) Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis* L.). *Food Chemistry*, 100, pp. 231-236.
- Faria, F.; Santos, R.S.; Vianna, L.M. (2006) Consumo de *Camellia sinensis* em população de origem oriental e incidência de doenças crônicas. *Revista de Nutrição*, 19 (2), pp. 275-279.
- Farris, P. (2007) Idebenone, green tea, and Coffeeberry® extract: new and innovative antioxidants. *Dermatologic Therapy*, 20 (5), pp. 322–329.
- Fernandez, J.S.C. (2010) *Química Bioinorgánica*. Editorial Síntesis, S.A. (Ed.), Madrid, 352 p (ISBN: 9788497560276).
- Ferrara, L.; Montesano, D.; Senatore, A. (2001) The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Il Farmaco*, 56, pp. 397-401.
- Ferrazzano, G.F.; Amato, I.; Ingenito, A.; De Natale, A.; Pollio, A. (2009) Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia*, 80, pp. 255-262.
- Fialová, S.; Tekelová, D.; Mrlianová, M.; Grančai, D. (2008) The Determination of Phenolics Compounds and Antioxidant Activity of Mints and Balms Cultivated in Slovakia. *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, 55, pp. 96-102.

- Figueiroa, T.T.H.; Rodríguez, E.R.; Sánchez-Muniz, F.J. (2004) El té verde ¿una buena elección para la prevención de enfermedades cardiovasculares?. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54 (4), pp. 380-394.
- Fisher, G.J.; Kang, S.; Varani, J.; Bata-Csorgo, Z.; Wan, Y.; Datta, S.; Voorhees, J.J. (2002) Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging. *Archives of Dermatology*, 138 (11), pp. 1462-1470.
- Fontes, A.L.; Lourenço, A. (2004) *Os chás dos congressos de Vilar de Perdizes*, 2ª Edição, Seara Gráfica, Lda., Montalegre.
- Fraser, K.; Harrison, S.J.; Lane, G.A.; Don E. Otter, D.E.; Hemar, Y.; Siew-Young Quek, S-Y.; Rasmussen, S. (2012) HPLC–MS/MS profiling of proanthocyanidins in teas: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis* 26, pp. 43–51.
- Frei, B.; Higdon, J.V. (2003) Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. *Journal of Nutrition*, 133 (10), pp. 3275S-3284S.
- Friedman, M.; Levin, C.E.; Choi, S-H.; Kozukue, E.; Kozukue, N. (2006) HPLC Analysis of Catechins, Theaflavins, and Alkaloids in Commercial Teas and Green Tea Dietary Supplements: Comparison of Water and 80% Ethanol/Water Extracts. *Food Chemistry and Toxicology* 71 (6), pp. C328-C337.
- Friedman, M.; Levin, C.E.; Choi, S-K.; Kozukue, E.; Kozukue, N. (2006) Dietary Supplements: Comparison of Water and 80% Ethanol/Water Extracts. *Journal of Food Science*, 71 (6), pp. C328-C337.
- Fukasawa, R.; Kanda, A.; Hara, S. (2009) Anti-oxidative effects of rooibos tea extract on autoxidation and thermal oxidation of lipids. *Journal of Oleo Science*, 58 (6), pp. 275-283.
- Gadow, A. von; Joubert, E.; Hansmann, C.F. (1997) Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry* 60(I), pp. 73-77.
- Gahler, S.; Otto, K. & Bohm, V. (2003) Alterations of Vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 7962-7968.
- Gahler, S.; Otto, K.; Bohm, V. (2003) Alterations of Vitamin C, Total Phenolics, and Antioxidant Capacity as Affected by Processing Tomatoes to Different Products. *J. Agric. Food Chem.* 51, pp.7962-7968.
- Galisa, M.S.; Esperança, L.M.B.; Sá, N.G. (2008) *Nutrição, Conceitos e Aplicações*. M. Books de Brasil Editora Lta. (Ed.), p 280 (ISBN: 978857680027-9).
- Gallaher, R.N.; Gallaher, K.; Marshall, A.J.; Marshall, A.C. (2006) Mineral analysis of ten types of commercially available tea, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp. S53-S57.
- Gao, X-H.; Zhang, L.; Wei, H.; Chen, H-D. (2008) Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology*, 26, pp. 367-374.
- Garcia-Cortes, M.; Borraz, Y.; Lucena, M.I.; Pelaez, G.; Salmeron, J.; Diago, M.; Martinez-Sierra, M.C.; Navarro, J.M.; Planas, R.; Soria, M.J.; Bruguera, M.; Andrade, R.J. (2008) Hepatotoxicidad secundaria a “productos naturales”: análisis de los casos notificados al Registro Español de Hepatotoxicidad. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 100 (11), pp. 688-695.
- Ge, Q.; Ma, X. (2013) Composition and antioxidant activity of anthocyanins isolated from Yunnan edible rose (*An ning*) *Food Science and Human Wellness* 2, pp.68–74.
- Geetha, T.; Garg, A.; Chopra, K.; Kaur, I.P. (2004) Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research*, 556, pp. 65-74.
- Ghedira, K. (2005) Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3 (4), pp. 162-169.

- Ghodake, H.M.; Goswami, T.K.; Chakraverty (2007) Moisture sorption isotherms, heat of sorption and vaporization of withered leaves, black and green tea, *Journal of Food Engineering*, 78, pp. 827-835.
- Gomes, E.C.; Elpo, E.R.S.; Negrelle, R.R.B. (2007) Armazenagem de chás no setor supermercadista, *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27 (4), pp. 675-680.
- Gordon, N.C.; Wareham, D.W. (2010) Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, pp. 129-131.
- Goto, T.; Yoshida, Y.; Kiso, M.; Nagashima, H. (1996) Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *Journal of Chromatography A*, 749, pp. 295-299.
- Gramza, A.; Korczak, J. (2005) Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16, pp. 351-358.
- Gramza, A.; Korczak, J.; Amarowicz, R. (2005) Tea Polyphenols – their antioxidant properties and biological activity – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14/15 (3), pp. 219-235.
- Guimarães, C.P.; Lanfer-Marquez, U.M. (2005) Estimativa de teor de fenilalanina em sopas desidratadas instantâneas: importância do nitrogênio de origem não-proteica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 4 (3), pp. 365-375.
- Gupta, J.; Siddique, Y.H.; Beg, T.; Ara, G.; Afzal, M. (2009) Protective role of green tea extract against genotoxic damage induced by anabolic steroids in cultured human lymphocytes. *Biology and Medicine*, 1 (2), pp. 87-99.
- Gupta, J.; Siddique, Y.H.; Beg, T.; Ara, G.; Afzal, M. (2008) A Review on the beneficial effects of tea polyphenols on human health. *International Journal of Pharmacology* 4(5), pp. 314-338.
- Hamilton-Miller, J.M.T. (1995) Antimicrobial Properties of Tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (11), pp. 2375-2377.
- Hamilton-Miller, J.M.T.; Shah, S. (1999) Disorganization of cell division of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a component of tea (*Camellia sinensis*): a study by electron microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 176, pp. 463-469.
- Han, J. H.; Kwon, O.S.; Chung, J. H.; Cho, K.H.; Eun, H.C.; Kim, K.H. (2004) Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *Journal of Dermatological Science* 34, pp. 91-98.
- Han, J.H.; Kwon, O.S.; Chung, J.H.; Cho, K.H.; Eun, H.C.; Kim, K.H. (2004) Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. *Journal of Dermatological Science*, 34, pp. 91-98.
- Han, W.Y.; Shi, Y.Z.; Ma, L.F.; Ruan, J.Y.; Zhao, F.J. (2007) Effect of liming and seasonal variation on lead concentration of tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Chemosphere*, 66, pp. 84-90.
- Harbowy, M.E.; Balentine, D.A. (1997) Tea Chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16(5), pp. 415-480.
- Hassani, A.S.; Amirmozafari, N.; Ordouzadeh, N.; Hamdi, K.; Nazari, R.; Ghaemi, A. (2008) Volatile components of *Camellia sinensis* inhibit growth and biofilm formation of oral streptococci *in vitro*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (10), pp. 1336-1341.
- Hatano, T.; Kusuda, M.; Hori, M.; Shiota, S.; Tsuchiya, T.; Yoshida, T. (2003) Theasinensin A, a Tea Polyphenol Formed from (-)-Epigallocatechin Gallate, Suppresses Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica*, 69 (11), pp. 984-989.
- Havsteen, B. H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96, pp. 67– 202.

- Hayacibara, M.F.; Queiroz, C.S.; Tabchoury, C.P.M.; Cury, J.A. (2004) Flúor e alumínio em chás e bebidas à base de chás. *Revista Saúde Pública*, 38 (1), pp. 100-105.
- He, Q.; Yao, K.; Jia, D.; Fan, H.; Liao, X.; Shi, B. (2009) Determination of total catechins in tea extracts by HPLC and spectrophotometry. *Natural Product Research*, 23, (1), pp. 93-100.
- Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, pp. 572-584.
- Heinrich, U.; Moore, C.E.; Spirt, S.; Tronnier, H.; Stah, W. (2011) Green Tea Polyphenols Provide Photoprotection, Increase Microcirculation, and Modulate Skin Properties of Women. *Journal of Nutrition*, 141, pp. 1202-1208.
- Heong, C.S.; Bhupinder, K.; Huda, N.; Karim, A.A.; Fazilah, A. (2011) Effect of fermentation on the composition of *Centella asiatica* teas. *American Journal of Food Technology* 6 (7), pp. 581-593.
- Higdon, J.V.; Frei, B. (2007) Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, pp. 101-123.
- Higdon, J.V.; Frei, B. (2003) Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43 (1), pp. 89-143.
- Ho, S-C.; Wub, S-P.; Lin, S-M.; Tang, Y-L. (2010) Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. *Food Chemistry*, 122, pp. 768-774.
- Hollman, P.C.; Katan, M.B. (1999) Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic Res. Suppl.*:S75-S80.
- Hong, In-Sun.; Hwa-Yong, L.; Hyun-Pyo; K. (2014) Anti-Oxidative Effects of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) on Immobilization-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *PloS one*, 9 (1), e87061.
- Hongmei, Z.; Wenyuan, Z.; Wenyan, Z.; Anlin, Y.; Yanlan, L.; Yan, J.; Shaosong, H.; Jianyu, S. (2014) Inhibitory Effects of Citral, Cinnamaldehyde, and Tea Polyphenols on Mixed Biofilm Formation by Foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Protection*, 6, pp. 872-1042.
- Hopia, A.; Heinonen, M. (1999) Antioxidant Activity of Flavonol Aglycones and Their Glycosides in Methyl Linoleate. *Journal of the American Oil Chemist` Society*, 76 (1), pp. 139-144.
- Horie, H.; Mukai, T.; Kohata, K. (1997) Simultaneous determination of qualitatively important components in green tea infusions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 758, pp. 332-335.
- Horžić, D.; Komes, D.; Belščak, A.; Ganić, K.K.; Iveković, D.; Karlovic, D. (2009) The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115, pp. 441-448.
- Hsu, S. (2005) Green tea and the skin. *Journal of American Academy of Dermatology*, 52, pp. 1049-1059.
- Ichihashi, M.; Ahmed, N.U.; Budiyo, A.; An Wu, A.; Bito, T.; Ueda, M.; Osawa, T. (2000) Preventive effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice. *Journal of Dermatological Science*, 23 (1), pp. S 45-S50.
- Ikigai, H.; Nakae, T.; Hara, Y.; Shimamura, T. (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1147, pp. 132-136.
- Imran, A.; Butt, M.S.; Sharif, M.K.; Sultan, J.I. (2013) Chemical Profiling of Black Tea Polyphenols. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12 (3), pp. 261-267.
- Imran, A.; Butt, M.S.; Yasin, M.; Imran, M.; Batool, R.; Naz, A. (2011) Phytochemical screening of different black tea brands. *Internet Journal of Food Safety*, 13, pp. 226-231.
- Intra, J.; Kuo, S-M. (2007) Physiological levels of tea catechins increase cellular lipid antioxidant activity of vitamin C and vitamin E in human intestinal Caco-2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 169, pp. 91-99.

- Ioannou, I.; Ghoul, M. (2012) Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants. *Nancy University – ENSAIA*, pp.101-124.
- Isaacs, C.E.; Wen, G.Y.; Xu, W.; Jia, J.H.; Rohan, L.; Corbo, C.; Maggio, V.Di.; Jenkins Jr, E.C.; Hillier, S. (2008) Epigallocatechin Gallate Inactivates Clinical Isolates of *Herpes simplex* Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (3), pp. 962-970.
- Isaacs, C.E.; Xu, W.; Merz, G.; Hillier, S.; Rohan, L.; Wen, G.Y. (2011) Digallate Dimers of (-)-Epigallocatechin Gallate Inactivate Herpes Simplex Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (12), pp. 5646-5653.
- Issa, M.; Karabet, F.; Aljoubbeh, M. (2013) Total Polyphenols, Flavonoid Content, Kaempferol Concentration And Antioxidant Activity Of Two Onion Syrian (Spring And White). *International Journal of ChemTech Research*, 5 (5), pp. 2375-2380.
- IST (1932) *Boletim de análise de chá*. Laboratório de Química Analítica, Instituto Superior Técnico, Lisboa.
- Ito, R.; Yamamoto, A.; Kodama, S.; Kato, K.; Yoshimura, Y.; Matsunaga, A.; Nakazawa, H. (2003) A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chemistry*, 83, pp. 563-568.
- Jain, D.P.; Pancholi, S.S.; Pate, R. (2011) Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. *J Adv Pharm Technol Res.* 2(3), pp.177–183.
- Jayaprakasha, G.K.; Selvi, T.; Sakariah, K.K. (2003) Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, pp. 117-122.
- Jayasekera, S.; Molan, A.L.; Garg, M.; Moughan, P.J. (2011) Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully-fermented Sri Lankan tea. *Food Chemistry*, 125, pp. 536-541.
- Jayasekera, S.; Molan, A.L.; Garg, M.; Moughan, P.J. (2011) Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully-fermented Sri Lankan tea. *Food Chemistry*, 125, pp. 536–541.
- Jobstl, E.; Fairclough, P.A.; Davies, A.P.; Williamson, M.P. (2005) Creaming in Black Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 7997-8002.
- Jun, X.; Deji, S.; Ye, L.; Rui, Z. (2011) Comparison of in vitro antioxidant activities and bioactive components of green tea extracts by different extraction methods. *International Journal of Pharmaceutics*, 408, pp. 97-101.
- Kahkonen, M.P.; Hopia, A.I.; Vuorela, H.J.; Rauha, J-P.; Pihlaja, K.; Kujala, T.S.; Heinonen, M. (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 3954-3962.
- Kakuda, T. (2002) Neuroprotective Effects of the Green Tea Components Theanine and Catechins. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25 (12), pp. 1513-1518.
- Kang-Mu, L.; Wan-Seok, K.; Jeesun, L.; Sunyoung, N.; Min, Y.; Seong-Won, N.; Younghoon, K.; Sae-Hun, K.; Woojun, P.; Sungsu, P. (2009) Antipathogenic Properties of Green Tea Polyphenol Epigallocatechin Gallate at Concentrations below the MIC against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 2, pp. 228-446.
- Kao, Y-H.; Hiipakka, R.A.; Liao, S. (2000) Modulation of Endocrine Systems and Food Intake by Green Tea Epigallocatechin Gallate. *Endocrinology*, 141 (3), pp. 980-987.
- Kara, D. (2009) Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chemistry*, 114, pp. 347-354.
- Karak, T.; Bhagat, R.M. (2010) Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. *Food Research International*, 43, pp. 2234-2252.
- Katalinic, V.; Milos, M.; Kulisic, T.; Jukic, M. (2006) Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94, pp. 550-557.

- Kerio, L.C.; Wachira, F.N.; Wavyoko, J.K.; Rotich, M.K. (2012) Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: extractin and identification. *Food Chemistry* 131, pp. 31-38.
- Kerio, L.C.; Wachira, F.N.; Wanyoko, J.K.; Rotich, M.K. (2013) Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food Chemistry*, 136, pp. 1405-1413.
- Khan, N.; Mukhtar, H. (2007) Minireview - Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, pp. 519-533.
- Khokhar, S.; Magnusdottir, S.G.M. (2002) Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 565-570.
- Khokhar, S.; Venemaa, D.; Hollmana, P.C.H.; Dekkerb, M.; Jongenb, W. (1997) A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Letters*, 114, pp. 171-172.
- Kim, S.; Ruengwilysup, C.; Fung, D.Y.C. (2004) Antibacterial Effect of Water-Soluble Tea Extracts on Foodborne Pathogens in Laboratory Medium and in a Food Model. *Journal of Food Protection*, 67 (11), pp. 2608-2612.
- Kim, Y.; Goodner, K.L.; Park, J-D.; Choi, J.; Talcott, S.T. (2011) Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of *Camellia sinensis* by oxidation during tea fermentation. *Food Chemistry* 129, pp.1331–1342.
- Kim, Y-K.; Oh, Y-J.; Chung, J-O.; Lee, S-J.; Kim, K-O. (2009) Chemical Composition of Green Teas According to Processing Methods and Extraction Conditions. *Food Science Biotechnology*, 18 (5), pp. 1212-1217.
- Kocadagli, T.; Ozdemir, K.S. ; Gokmen, V. (2013) Effects of infusion conditions and decaffeination on free amino acids profile of green and black tea. *Food Research International* 53(2), pp.720-725.
- Komes, D.; Horžić, D.; Belscak, A.; Ganic, K.K.; Vulic, I. (2010) Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, 43, pp. 167-176.
- Kono K.; Tatara I.; Takeda S.; Arakawa K.; Hara Y.(1994) Antibacterial activity of epigallocatechin gallate against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Kansenshogaku Zasshi* 68(12), pp.1518-1522.
- Kono, K.; Tatara, I.; Takeda, S.; Arakawa, K.; Hara, Y. (1994) Antibacterial activity of epigallocatechin gallate against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Kansenshogaku Zasshi*, 68 (12), pp. 1518-1522.
- Koo, M.W.L.; Cho, C.H. (2004) Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology*, 500, pp. 177-185.
- Kuhr, S.; Engelhardt, U.H. (1991) Determination of flavanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 192, pp. 526-529.
- Kumar, A.; Nair, A.G.C.; Reddy, A.V.R.; Garg, A.N. (2005) Availability of essential elements in Indian and US tea brands, *Food Chemistry*, 89, pp. 441-448.
- Kumar, S.; Pandey, A.K. (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview.*The Scientific World Journal*, pp. 1-16.
- Kuroda, Y.; Hara, Y. (1999) Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research* 436, pp. 69-97.
- Kwon, O.S.; Han, J.H.; Yoo, H.G.; Chung, J.H.; Cho, K.H.; Eun, H.C.; Kim, K.H. (2007) Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine*, 14, pp. 551-555.
- Kyle, J. A.M.; Morrice, P. C.; McNeill, G.; Duthie, G.G. (2007) Effects of Infusion Time and Addition of Milk on Content and Absorption of Polyphenols from Black Tea. *J. Agric. Food Chem.* 55, pp. 4889–4894.

- Labbé, D.; Provençal, M.; Lamy, S.; Boivin, D.; Gingras, D.; Béliveau, R. (2009) The Flavonols Quercetin, Kaempferol, and Myricetin Inhibit Hepatocyte Growth Factor-Induced Medulloblastoma Cell Migration. *The Journal of Nutrition*, 139 (4), pp.646-652.
- Labbé, D.; Tremblay, A.; Bazinet, L. (2006) Effect of brewing temperature and duration on green tea catechin solubilization: Basis for production of EGC and EGCG-enriched fractions. *Separation and Purification Technology* 49, pp. 1–9.
- Lachman, J.; Orsák, M.; Pivec, V.; Dudjak, J., Krym, O. (2003) Polyphenol content in green, black and oolong tea (*Camellia Sinensis* /L./ Kuntze) Infusions in different times of tea maceration. *Scientia Agricultura e Bohemica* 34 (1), pp. 22-28.
- Lakenbrink, C.; Lapczynski, S.; Maiwald, B.; Engelhardt, U.H. (2000) Flavonoids and Other Polyphenols in Consumer Brews of Tea and Other Caffeinated Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, pp. 2848-2852.
- Lamarão, R.C.; Fialho, E. (2009) Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. *Revista de Nutrição*, 22 (2), pp. 257-269.
- Lambert, J.D.; Yang, C.S. (2003) Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research*, 523-524, pp. 201-208.
- Lee, R-J.; Lee, V.S.Y.; Tzen, J.T.C.; Lee, M-R. (2010) Study of the release of gallic acid from (–)-epigallocatechin gallate in old oolong tea by mass spectrometry. *Rapid Communications Mass Spectrometry*, 24, pp. 851-858.
- Lester, G.E.; Lewers, K.S.; Medina, M.B.; Saftner, R.A. (2012) Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, pp. 102-107.
- Leung, L.K.; Su, Y.; Chen, R.; Zhang, Z.; Huang, Y.; Chen, Z-Y. (2001) Theaflavins in Black Tea and Catechins in Green Tea Are Equally Effective Antioxidants. *Journal of Nutrition*, 131 (9), pp. 2248-2251.
- Li, N.; Taylor, L.S.; Mario G. Ferruzzi, M.G.; Lisa J. Mauer, L.J. (2012) Kinetic Study of Catechin Stability: Effects of pH, Concentration, and Temperature. *J. Agric. Food Chem.* 60, pp. 12531–12539.
- Li, X.; Xie, C.; He, Y.; Qiu, Z.; Zhang, Y. (2012) Characterizing the Moisture Content of Tea with Diffuse Reflectance Spectroscopy Using Wavelet Transform and Multivariate Analysis. *Sensors*, 12, pp. 9847-9861.
- Liang, Y.; Lu, J.; Zhang, L.; Wu, S.; Wu, S.Y. (2003) Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions, *Food Chemistry*, 80, pp. 283-290.
- Liang, Y.; Ma, W.; Lu, J.; Wu, Y. (2001) Comparison of chemical compositions of *Ilex latifolia* Thumb and *Camellia sinensis* L. *Food Chemistry*, 75, pp. 339-343.
- Liang, Y.; Xu, Y. (2003) Effect of extraction temperature on cream and extractability of black tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze].. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, pp. 37-45.
- Liebert, M.; Licht, U.; Böhm, V.; Bitsch, R. (1999) Antioxidant properties and total phenolics content of green and black tea under different brewing conditions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 208, pp. 217-220.
- Lima, J.D.; Mazzafera, P.; Moraes, W.S.; Silva, R.B. (2009) Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, 39 (4), pp. 1270-1278.
- Lin, I-Jr.; Cham, T-M.; Wu, S-M. (2010) Simultaneous Determination of Hesperidin, Ferulic Acid, Cinnamic Acid and Cinnamaldehyde in Chinese Tonic Wine by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 57, pp. 429-435.

- Lin, L-Z.; Chen, P.; Harnly, J.M. (2008) New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas. *J. Agric. Food Chem.* 56, pp. 8130–8140.
- Lin, Y-S.; WU, S-S.; Lin, J-K. (2003) Determination of Tea Polyphenols and Caffeine in Tea Flowers (*Camellia sinensis*) and Their Hydroxyl Radical Scavenging and Nitric Oxide Suppressing Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 975-980.
- Lin, Z-H.; Yi-Ping Qi, Y-P.; Chen, R-B.; Zhang, F-Z.; Chen, L.S. (2012) Effects of phosphorus supply on the quality of green tea. *Food Chemistry*, 130, pp. 908-914.
- Liu, J.; Xing, J.; Fei, Y. (2008) Green tea (*Camellia sinensis*) and cancer prevention: a systematic review of randomized trials and epidemiological studies. *Chinese Medicine*, 3, pp. 12 (doi: [10.1186/1749-8546-3-12](https://doi.org/10.1186/1749-8546-3-12))
- Luczaj, W.; Skrzydlewska, E.W. (2005) Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, 40, pp. 910-918.
- Macedo, J.A.; Battestin, V.; Ribeiro, M.L.; Macedo, G.A. (2011) Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. *Food Chemistry*, 126, pp. 491-497.
- Malik, J.; Szakova, J.; Drabek, O.; Balik, J.; Kokoska, L. (2008) determination of certain micro and macroelements in plant simulants and their infusions, *Food Chemistry*, 111, pp. 520-525.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 81 (suppl), pp. 230S– 242S.
- Manian, R.; Anusuya, N.; Siddhuraju, P.; Manian, S. (2008) The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry*, 107, pp. 1000-1007.
- Marcos, A.; Fisher, A.; Reab, G.; Hill, S.J. (1998) Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13, pp. 521-525.
- Marques, V.; Farah, A. (2009) Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113, pp. 1370-1376.
- Martino, K.G.; Paul, M.S.; Pegg, R.B.; Kerr, W.L. (2013) Effect of time and temperature conditions and clarification on the total phenolics and antioxidant constituents of muscadine grape juice. *LWT - Food Science and Technology*, 53, pp. 327-330.
- McKenzie, J.S.; Jurado, J.M.; Pablos, F. de (2010) Characterisation of tea leaves according to their total mineral content by means of probabilistic neural networks. *Food Chemistry*, 123, pp. 859-864.
- Mehra, A.; Baker, C.L. (2007) Leaching and bioavailability of aluminum, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 100, pp. 1456-1463.
- Michiels, J.A. ; Kevers, C. ; Pincemail, J. ; Defraigne, J.O. ; Dommes, J. (2012) Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry* 130, pp. 986–993.
- Miean, K.H.; Mohamed, S. (2001) Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (6), pp. 3106-3112.
- Mishra, K.; Ojha, H.; Chaudhury, N.K. (2012) Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH_ assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, pp. 1036-1043.
- Mizukami, Y.; Sawai, Y.; Yamaguchi, Y. (2007) Simultaneous Analysis of Catechins, Gallic Acid, Strictinin, and Purine Alkaloids in Green Tea by Using Catechol as an Internal Standard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 4957-4964.

- Mohammed, M.I.; Sulaiman, M.A. (2009) Proximate, caffeine and tannin analyses in some brands of tea consumed in Kano metropolis, Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2 (2), pp. 19-21.
- Mohammed, M.J.; Al-Bayati, F.A. (2009) Isolation, identification and purification of caffeine from *Coffea arabica* L. and *Camellia sinensis* combination antibacterial study. *International Journal of Green Pharmacy*, 3, pp. 52-57.
- Moraes de Souza, R.A.; Oldoni, T.L.C.; D'Arce, M.A.B.R.; Alencar, S.M. (2008) Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Herbal Infusions Consumed in Brazil. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 6 (1), pp. 41-47.
- Mossion, A.; Potin-Gautier, M.; Delerue, S.; Le Hécho, I.; Behra, P. (2008) Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions. *Food Chemistry*, 106, pp. 1467-1475.
- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Manuel Dominguez, J.M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Núñez, M.J.; Parajó, J.C. (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, pp. 145-171.
- Mujeeb, F.; Bajpai, P.; Pathak, N. (2014) Phytochemical Evaluation, Antimicrobial Activity, and Determination of Bioactive Components from Leaves of *Aegle marmelos*. *BioMedical Research International*, Vol. 2014, Article ID 497606, p.11.
- Mukherjee, P.K.; Maity, N.; Nema, N.K.; Birendra K.; Sarkar, B.K. (2011) Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine*, 19, pp. 64-73.
- Munin, A.; Edwards-Lévy, F. (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3, pp. 793-829.
- Muradian, L.B.A.; Vanderlinde, D.W.; Sasaki, R. (2000) Provitamin A Activity of Raw and Cooked Brazilian leaves. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20 (2), pp. 1-5.
- Natella, F.; Nardini, M.; Felice, M. di; Scaccini, C. (1999) Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure-Activity Relation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp. 1453-1459.
- Navarro-Martínez, M.D.; Navarro-Perán, E.; Cabezas-Herrera, J.; Ruiz-Gómez, J.; García-Cánovas, F.; Rodríguez-López, J.N. (2005) Antifolate Activity of Epigallocatechin Gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (7), pp. 2914-2920.
- Negi, P.S.; Chauhan, A.S.; Sadia, G.A.; Rohinishree, Y.S.; Ramteke, R.S. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 92, pp. 119-124.
- Nepote, V.; Grosso, N.R.; Guzmán, C.A. (2005) Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, pp. 33-38.
- Nie, S.; Xie, M.; Fu, Z.; Wan, Y.; Yan, A. (2008) Study on the purification and chemical compositions of tea glycoprotein. *Carbohydrate Polymers*, 71, pp. 626-633.
- Nielsen, S. (2003) Food Analysis. 3rd ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Nirmal, N.P.; Benjakul, S. (2011) Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. *LWT - Food Science and Technology*, 44, pp. 924-932.
- Nishitani, E.; Sagesaka, Y.M. (2004) Simultaneous determination of catechins, caffeine and other phenolic compounds in tea using new HPLC method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, pp. 675-685.
- Nishiyama, M.F.; Costa, M.A.F.; Costa, A.M. da, Souza, C. G. M.de; Bôer, C.G.; Bracht, C.K.; Rosane Marina Peralta, R.M. (2010) Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de

- extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30(Supl.1), pp. 191-196.
- Novak, I.; Šeruga, M.; Komorsky-Lovric, S. (2010) Characterisation of catechins in green and black teas using square-wave voltammetry and RP-HPLC-ECD. *Food Chemistry*, 122, pp. 1283-1289.
- Oh, J.; Jo, H.; Cho, A.R.; Sung-Jin Kim, S-J.; Han, J. (2013) Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31, pp. 403-409.
- Okubo, S.; Toda M.; Hara, Y.; Shimamura, T. (1991) Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against *Trichophyton*. *Nihon Saikingaku Zasshi*, 46 (2), pp. 509-14.
- Oliveira, A.C.; Valentim, I.A.; Cícero Alexandre Silva, C.A.; Bechara, E.J.H.; Barros M.P.; Marinho, C.M.; Goulart, M.O.F. (2009) Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, 115, pp. 469-475.
- Olivier, J.; Symington, E.A.; Jonker, C.Z.; Rampedi, I.T.; Eeden, T.S. van (2012) Comparison of the mineral composition of leaves and infusions of traditional and herbal teas. *South African Journal of Science*, 108 (1/2), pp. 1-7.
- Olsen, H.; Aaby, K.; Borge, G.I.A. (2009) Characterization and Quantification of Flavonoids and Hydroxycinnamic Acids in Curly Kale (*Brassica oleracea* L. Convar. *acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp. 2816-2825.
- Ortíz, M. A.; Vargas, M. del C.R.; Madinaveitia, R.G.C.; Velázquez, J.A.M. (2011) Propriedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XIII (2), pp. 16-22.
- Ottaviani, J.I.; Momma, T.Y.; Heiss, C.; Kwik-Urbe C.; Schroeter, H.; Keen, C.L. (2011) The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo *Free Radical Biology & Medicine* 50, pp. 237-244.
- Ozcan, M.M.; Unver, A.; Uc_ar,T.; Arslan, D. (2008) Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction, *Food Chemistry*, 106, pp. 1120-1127.
- Ozgen, M.; Reese, R. N.; Túlio Jr., A.Z.; Scheerens, J. C.; Miller, A. R. (2006) Modified 2,2-Azino bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2,6,6-Tetramethyl-p-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *J. Agric. Food Chem.* 54, pp. 1151-1157.
- Ozgen, M.; Reese, R.N.; Tulio J.R.; Scheerens, J.C.; Miller, A.R. (2006) Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2,6,6-Tetramethyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 1151-1157.
- Ozkan, G.; Sagdiç, O.; Baydar, N.G.; Kurumahmutoglu, Z. (2004) Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, pp. 1807-1811.
- Özşen, D.; Erge, H.S. (2013) Degradation Kinetics of Bioactive Compounds and Change in the Antioxidant Activity of Wild Strawberry (*Fragaria vesca*) Pulp During Heating. *Food Bioprocess Technology*, 6, pp. 2261-2267.
- Pacheco, J.A. (2005) *Porto Formoso: um chá no oceano*. Pacheco e Mendonça, Lda., Ponta Delgada.
- Padmini, E.; Prema, K.; Geetha, B.V.; Rani, M.U. (2008) Comparative study on composition and antioxidant properties of mint and black tea extract. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1887-1895.
- Pastore, R.L.; Fratellone, P. (2006) Potential health benefits of green tea (*Camelia sinensis*): A narrative review. *Diet and Nutrition*, EXPLORE, 2 (6), pp. 531-539.

- Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, pp. 1123-1128.
- Peng, L.; Song, X.; Shi, X.; Li, J.; Ye, C. (2008) An improved HPLC method for simultaneous determination of phenolic compounds, purine alkaloids and theanine in *Camellia* species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, pp. 559-563.
- Pereira, A.V.; Almeida, T.C.; Beltrame, F.L.; Costa, M.E., Garrido, L.H. (2009) Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto - *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, *Theaceae*, *Acta Scientiarum, Health Sciences*, 31 (2), pp. 119-124.
- Pérez-Conesa, D.; García-Alonso, J.; García-Valverde, V.; Iniesta, M-D.; Jacob, K.; Luis Manuel Sánchez-Siles, L.M.; Ros, G.; Periago, M.J. (2009) Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, pp. 179-188.
- Perva-Uzunalić, A.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Weinreich, B.; Otto, F.; Grüner, S. (2006) Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96, pp. 597-605.
- Pessuto, M.B.; Costa, I. C. da; Souza, A.B. de; Nicoli, F. M.; Mello, J.C.P. de (2009) Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Quim. Nova* 32(2), pp. 412-416.
- Petisca, C.; Melo, A.; Isabel, M.P.L.V.O.; Ferreira, I.P.L.V.O.; Pinho, O. (2009) Brewing practices to maximise levels of catechins and other compounds with functional properties in Azorean green tea infusions: comparison with composition of canned green tea drinks. *Journal of Food Service*, 20, pp. 241-249.
- Phillips, E.V. (2007) *O livro do chá: a história, o rito e a prática*. 3ª edição, Colares Editora, Sintra.
- Pilgrim, T.S.; Watling, R.J.; Grice, K. (2010) Application of trace element and stable isotope signatures to determine the provenance of tea (*Camellia sinensis*) samples. *Food Chemistry*, 118, pp. 921-926.
- Pinnell, S.R. (2003) Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of American Academy of Dermatology*, 48, pp.1-19.
- Piovan, A.; Filippini, R.; Vecchia, F. D.; Caniato, R. (2014) Comparative Study of Leaf Morphology, Phenolics and Methylxanthines in *Camellia sinensis* Teas from the Italian Market. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2 (5), pp.154-160.
- Porgali, E.; Büyüktünel, E. (2012) Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International* 45, pp. 145-154.
- Porto, A.; Oliveira, L. (2006) Tabela da composição de alimentos. Centro de Segurança Alimentar e Nutrição / Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Porto, A. e Oliveira, L. (Eds.), Lisboa.
- Price, K.R.; Rhodes, M.J.C.; Barnes, K.A. (1998) Flavonol Glycoside Content and Composition of Tea Infusions Made from Commercially Available Teas and Tea Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp. 2517-2522.
- Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kahkonen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K-M. (2001) Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp. 494-507.
- Pytlakowska, K.; Kita, A.; Janoska, P.; Połowniak, M.; Kozik, V. (2012) Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. *Food Chemistry*, 135, pp. 494-501.

- Rahim, A.A.; S. Nofrizal, S.; Saad, B. (2014) Rapid tea catechins and caffeine determination by HPLC using microwave-assisted extraction and silica monolithic column. *Food Chemistry* 147, pp. 262–268.
- Ramalho, S. A.; Nigam, N.; Oliveira, G.B.; Oliveira, P. A. de; Silva, T. O. M.; Santos, A. G. P. dos; Narain, N. (2013) Effect of infusion time on phenolic compounds and caffeine content in black tea. *Food Research International* 51, pp.155–161.
- Rauha, J-P.; Remes, S.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Kahkonen, M.; Kujala, T.; Pihlaja, K.; Vuorela, H.; Vuorela, P. (2000) Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56, pp. 3-12.
- Record, I.R.; Lane, J.M. (2001) Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry*, 73, pp. 481-486.
- Rehman, S-Ur.; Almas, K.; Shahzadi, N.; Bhatti, N.; Saleem, A. (2002) Effect of Time and Temperature on Infusion of Tannins from Commercial Brands of Tea. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4 (2), pp. 285-287.
- Reto, M.; Figueira, M.E.; Filipe, H.M.; Almeida, C.M.M. (2007) Chemical composition of green tea (*Camellia sinesis*) infusions commercialized in Portugal, *Plant Foods Human Nutrition*, 62, pp. 139-144.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), pp. 933-956.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trend in Plant Science* 2 (4), pp. 152-159.
- Riehle, P.; Vollmer, M.; Rohn, S. (2013) Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions - Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. *Food Research International*, 53(2), pp. 891-899.
- Rietveld, A.; Wiseman, S. (2003) Antioxidant Effects of Tea: Evidence from Human Clinical Trials. *Journal of Nutrition*, 133, pp. 3285S-3292S.
- Roberts, E.A.H. (1963) The phenolic substances of manufactured tea. X-the creaming down of tea liquors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 14, pp. 700-705.
- Romero, A.M.; Doval, M.M.; Sturla, M.A.; Judis, M.A. (2004) Antioxidant properties of polyphenol-containing extract from soybean fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, pp. 424-431.
- Rossi, M.; Garavello, W. ; Talamini, R. ; et al. (2007) Flavonoids and the risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16, pp.1621-1625.
- Row, K.H.; Jin, Y. (2006) Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. *Bioresource Technology*, 97, pp. 790-793.
- Rubio, C.; Lucas, J.R.D.; Gutiérrez, A.J.; Glez-Weller, D.; Marrero, B.P.; Caballero, J.M.; Revert, C.; Hardisson, A. (2012) Evaluation of metal concentrations in mentha herbal teas (*Mentha piperita*, *Mentha pulegium* and *Mentha* species) by inductively coupled plasma spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, pp. 11-17.
- Rusak, G.; Komes, D.; Saša Likic, S.; Horžić, D.; Kovac, M. (2008) Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110, pp. 852-858.
- Sahari, M.A.; Asgari, S. (2013) Effects of Plants Bioactive Compounds on Foods Microbial Spoilage and Lipid Oxidation. *Food Science and Technology*, 1 (3), pp. 52-61.
- Saito, S.T.; Welzel, A.; Suyenaga, E.S.; Bueno, F. (2006) A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), Catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. *Revista de Ciência e Tecnologia Alimentar*, 26 (2), pp. 394-400.

- Sakai, I.; Izumi, S.-i.; Murano, T.; Okuwaki, S.; Makino, T.; Suzuki, T. (2001) Presence of Aldose Reductase Inhibitors in Tea Leaves. *Japanese Journal of Pharmacology*, 85, pp. 322-326.
- Sakakibara, H.; Honda, Y.; Nakagawa, S.; Ashida, H.; Kanazawa, K. (2003) Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, pp. 571-581.
- Sakanaka, S.; Juneja, L.R.; Taniguchi, M. (2000) Antimicrobial Effects of Green Tea Polyphenols on Thermophilic Spore-Forming Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (1), pp. 81-85.
- Salahinejad, M.; Aflaki, F. (2010) Toxic and Essential Mineral Elements Content of Black Tea Leaves and Their Tea Infusions Consumed in Iran. *Biological Trace Element Research*, 134, pp. 109-117.
- Samaniego-Sánchez, C.; Inurreta-Salinas, Y.; Quesada-Granados, J.J.; Blanca-Herrera, R.; Villalón-Mir, M.; Serrana, H.L-G de la; Martinez, L.M.C. (2011) The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, pp. 79-86.
- Sandeep, K.; Nisha, S.; Shweta, A. (2012) Green Tea Polyphenols: Versatile Cosmetic Ingredient. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences*, 1 (3), pp. 348-362.
- Sandhar, H.K., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., Sharma, P. (2011) A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia* 1 (1), pp. 25-41.
- Sang, S.; Cheng, X.; Stark, R.E.; Rosen, R.T.; Yang, C.S.; Ho, C-T. (2002) Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of tea Catechins: Analysis of Radical Reaction Products of Catechin and Epicatechin with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, pp. 2233-2237.
- Sang, S.; Lambert, J. D.; Ho, C-T.; Yang, C.S. (2011) Review The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological Research* 64, pp. 87– 99.
- Scharbert, S.; Hofmann, T. (2005) Molecular Definition of Black Tea Taste by Means of Quantitative Studies, Taste Reconstitution, and Omission Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, pp. 5377-5384.
- Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. (2004) Identification of the Astringent Taste Compounds in Black Tea Infusions by Combining Instrumental Analysis and Human Bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 3498-3508.
- Schroeter, H.; Heiss, C.; Spencer, J.P.E.; Keen, C.L.; Lupton, J.R.; Schmitz, H.H. (2010) Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: current knowledge and future needs. *Molecular Aspects of Medicine* 31, pp. 546–557.
- Scoparo, C.T.; Souza, L.M. de; Dartora, N.; Sassaki, G.L.; Gorin, P.A.J.; Iacomini, M. (2012) Analysis of *Camellia sinensis* green and black teas via ultra high performance liquid chromatography assisted by liquid–liquid partition and two-dimensional liquid chromatography (size exclusion × reversed phase). *Journal of Chromatography A*, 1222, pp. 29-37.
- Sedaghathoor, S.; Torkashvand, A.M.; Hashemabadi, D.; Kaviani, B. (2009) Yield and quality response of tea plant to fertilizers. *African Journal of Agricultural Research*, 4 (6), pp. 568-570.
- Seenivasan, S.; Manikandan, N.; Muraleedharan, N.N.; Selvasundaram, R. (2008) Heavy metal content of black teas from south India, *Food Control*, 19, pp. 746-749.
- Séguier, J. (2001) *Dicionário Lello Prático Ilustrado*, s.l.: Lello Editores (Eds.), p. 2026 (ISBN: 978-972-48-1808-5).

- Senger, A.E.V.; Schwanke, C.H.A.; Gottlieb, M.G.V. (2010) Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Scientia Medica*, 20 (4), pp. 292-300.
- Serpen, A.; Pelvan, E.; Alasalvar, C.; Mogol, B.A.; Yavuz, H.T.; Gokmen, V.; Ozcan, N.; Ozcelik, B. (2012) Nutritional and Functional Characteristics of Seven Grades of Black Tea Produced in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, pp. 7682-7689.
- Shaghaghi, M.; Jamshid, L.; Manzoori, J.L.; Jouyban, A. (2008) Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chemistry*, 108, pp. 695-701.
- Sharangi, A.B. (2009) Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review. *Food Research International*, 42, pp. 529-535.
- Sharma, O.P.; Bhat, T.K. (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, pp. 1202-1205.
- Sharma, V.; Gulati, A.; Ravindranath, S.D. (2005a) Extractability of tea catechins as a function of manufacture procedure and temperature of infusion. *Food Chemistry*, 93, pp. 141-148.
- Sharma, V.; Gulati, A.; Ravindranath, S.D.; Kumar, V. (2005) A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, pp. 583-594.
- Shen, C.L.; Yeh, J.K.; Cao, J.J.; Wang, J.S. (2009) Green tea and bone metabolism. *Nutrition Research*, 29, pp. 437-456.
- Shen, F-M.; Hong-Wen, C. (2008) Element composition of tea leaves and tea infusions and its impact on health. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, pp. 300-304.
- Shokrzadeh, M.; Ebadi, A.G.; Mirshafiee, S.S.; Choudhary, M.I. (2006) Effect of the Aqueous Green Leaf Extract of Green Tea (*Camellia sinensis*) on Glucose Level of Rat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9 (14), pp. 2708-2711.
- Shukla, Y. (2007) Tea and Cancer Chemoprevention: A Comprehensive Review. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, 8, pp. 155-166.
- Si, W.; Gong, J.; Tsao, R.; Kalab, M.; Yang, R.; Yin, Y. (2006) Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, 1125, pp. 204-210.
- Singh, D.K.; Banerjee, S.; Porter, T.D. (2009) Green and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP kinase to decrease cholesterol synthesis in hepatoma cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, pp. 816-822.
- Singleton, V.L. (1987) Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *American Journal of Enology and Viticulture* 38 (1), pp. 69-77.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A.Jr. (1985) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (1), pp. 44-68.
- Siripatrawan, U.; Harte B.R. (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 24 (8), pp. 770-775.
- Siripatrawan, U.; Noipha, S. (2012) Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27, pp. 102-108.
- Smith, A.H.; Imlay, J.A.; Mackie, R.I. (2003) Increasing the Oxidative Stress Response Allows *Escherichia coli* to Overcome Inhibitory Effects of Condensed Tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6), pp. 3406-3411.
- Song, J.M.; Seong, B.L. (2007) Tea catechins as a potential alternative antiinfectious agent. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 5, (3), pp. 497-506.

- Song, J.-M.; Lee, K.-H.; Seong, B.-L. (2005) Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*, 68, pp. 66-74.
- Song, R.; Kelman, D.; Johns, K.L.; Wright, A.D. (2012) Correlation between leaf age, shade levels, and characteristic beneficial natural constituents of tea (*Camellia sinensis*) grown in Hawaii. *Food Chemistry* 133, pp. 707–714.
- Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, pp. 200-213.
- Soomro, T.M.; Zahir, E.; Mohiuddin, S.; Khan, A.N.; Naqvi, I.I. (2008) Quantitative assessment of metals in local brands of tea in Pakistan. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (2), pp. 285-289.
- Sousa, S.M. (2012) A cultura do chá em São Miguel. In: *Jornal Açoriano Oriental*, Ponta Delgada: Açormédia, S.A., 22 de Abril, 2012.
- Stapleton, P.D.; Gettert, J.; Taylor, P.W. (2006) Epicatechin gallate, a component of green tea, reduces halotolerance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 111, pp. 276-279.
- Stapleton, P.D.; Shah, S.; Hamilton-Miller, J.M.T.; Hara, Y.; Nagaoka, Y.; Ayako Kumagai, A.; Uesato, S.; Taylor, P.W. (2004) Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-*O*-acyl-catechins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, pp. 374-380.
- Staszewski, M. von; Pilosof, A.M.R.; Jagus, R.J. (2011) Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, 125, pp. 186-192.
- Stewart, A. J.; Mullen, W.; Crozier, A. (2005) On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, pp. 52–60.
- Su, Y.L.; Leung, L.K.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y. (2003) Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry*, 83, pp. 189-195.
- Subramanian, R.; Gayathri, S.; Rathnavel, C.; Raj, V. (2012) Analysis of mineral and heavy metals in some medicinal plants collected from local market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (1), pp. S74-S78.
- Subramanian, R.; Subramaniyan, P.; Raj, V. (2012) Determination of some minerals and trace elements in two tropical medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (2), pp. S555-S558.
- Sueoka, N.; Suganuma, M.; Sueoka, E.; Okabe, S.; Matsuyama, S.; Imai, K.; Nakachi, K.; Fujiki, H. (2006) A New Function of Green Tea: Prevention of Lifestyle-related Diseases. *Annals of New York Academy of Sciences*, 928, pp. 274-280.
- Sueoka, N.; Suganuma, M.; Sueoka, E.; Okabe, S.; Matsuyama, S.; Imai, K.; Nakachi, K.; Fujiki, H. (s.d.) A New Function of Green Tea: prevention of lifestyle-related diseases, pp.274-280.
- Sultana, B.; Anwar, F.; Ashraf, M. (2009) Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. *Molecules*, 14, pp. 2167-2180.
- Sung, H.; Nah, J.; Chun, S.; Park, H.; Yang, S.; Min, W. (2000) In vivo antioxidant effect of green tea. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54, pp. 527-529.
- Supico, F.M. (1903) *Escavações*, Vol. III, ICPD (Ed.), Ponta Delgada, p. 1031.
- Suteerapataranon, S.; Butsoongnern, J.; Punturat, P.; Jorpalit, W.; Thanomsilp, C. (2009) Caffeine in Chiang Rai tea infusions: Effects of tea variety, type, leaf form, and infusion conditions. *Food Chemistry*, 114, pp. 1335-1338.

- Szymczycha-Madeja, A.; Welna, M.; Pohl, P. (2012) Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 35, pp. 165-181.
- Tabart, J. ; Kevers, C.; Pincemail, J.; Jean-Olivier Defraigne, J-O.; Dommes, J. (2009) Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113, pp. 1226–1233.
- Tahira, R.; Naeemullah, M.; Akbar, F.; Masood, M.S. (2011) Major Phenolic Acids of Local and Exotic Mint Germplasm Grown in Islamabad. *Pakistan Journal of Botany*, 43, pp. 151-154.
- Taneja, P.; Arora, A.; Shukla, A.Y. (2003) Antimutagenic Effects of Black Tea in the *Salmonella typhimurium* Reverse Mutation Assay. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 4, pp. 193-198.
- Taylor, P.W.; Hamilton-Miller, J.M.T.; Stapleton, P.D. (2005) Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Science & Technology Bulletin*, 2, pp. 71-81.
- Teixeira, J.; Gaspar, A.; Garrido, E.M.; Garrido, J.; Borges, F. (2013) Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview. *BioMed Research International*, 2013, pp.1-11.
- Tian, M.; Yan, H.; Row, K. H.(2010) Extraction Solid-Phase Extraction of Caffeine and Theophylline from green tea by a new ionic liquid-modified functional polymer sorbent. *Analytical Letters*, 43, pp.110–118.
- Toschi, T.G.; Bordoni, A.; Hrelia, S.; Bendini, A.; Lercker, G.; Biagi, P.L. (2000) The Protective Role of Different Green Tea Extracts after Oxidative Damage Is Related to Their Catechin Composition. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, pp. 3973-3978.
- Tran, J. (2013) Green Tea: A Potential Alternative Anti-Infectious Agent Catechins and Viral Infections. *Advances in Anthropology*, 3 (4), pp. 198-202.
- Tran, L.; Naik, A.; Koronkiewicz, B.; Peethambaran, B. (2014) Epigallocatechin Gallate Inhibits Biofilm Production and Attenuates Virulent Factors of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescence*. *Journal of Natural Remedies*, 14 (1), pp. 106-111.
- Tsao, R.; Yang, R.; Xie, S.; Sockovie, E.; Khanizadeh, S. (2005) Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple? *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, pp. 4989-4995.
- Turkmen, N.; Sari, F.; Velioglu, Y.S. (2006) Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods, *Food Chemistry*, 99, pp. 835-841.
- Turkmen, N.; Velioglu, Y.S.; Ferda Sari, F.; Polat, G. (2007) Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 12, pp. 484-496.
- Vaquero, M.J.R.; Alberto, M.R.; Manca de Nadra, M.C. (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18, pp. 93-101.
- Vaquero, M.J.R.; M.R. Alberto, M.R.; Nadra, M.C.M. de (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18, pp. 93–101.
- Venditti, E.; Bacchetti, T.; Tiano, L.; Carloni, P.; Greci, L.; Damiani, E. (2010) Hot vs. Cold water steeping of different teas: do they affect antioxidant activity? *Food Chemistry* 119, pp. 1597-1604.
- Vermaak, I.; Viljoen, A.M.; Hammana, J.H.; Van Vuuren, S.F. (2009) Effect of simulated gastrointestinal conditions and epithelial transport on extracts of green tea and sage. *Phytochemistry Letters*, 2, pp. 166-170.
- Vermeer, M.A.; Mulder, T.P.J.; Molhuizen, H.O.F. (2008) Theaflavins from Black Tea, Especially Theaflavin-3-gallate, Reduce the Incorporation of Cholesterol into Mixed Micelles *J. Agric. Food Chem.* 56, pp.12031–12036.

- Vidya, T.J.; Julkarni, K.S. (2002) Beneficial Effect of Green Tea with Special Reference to Neuroptathy: review and pilot trial. *Ancient Science of Life*, XXII (1), pp. 1-6.
- Vinson, J.A.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. (2001) Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, pp. 5315-5321.
- Vinson, J.A.; Yousef, A.; Dabbagh, M.A. (1998) Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea. Fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research* 18, (6), pp. 1067-1075.
- Vissiennon, C.; Nieberb, K.; Kelberc, O.; Butterweck, V. (2012) Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin — are they prodrugs? *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, pp.733–740.
- Volp, A. C. P.; Renhe, I.R.T.; Barra, K.; Stringueta, P.C. (2008) Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Rev Bras Nutr Clin* 23(2), pp. 141-149.
- Wafa, Y. A. el; Fernandez, A. B.; Fabuel, A.T.; Ramos, M. A. P.; Ramos-Clemente, J.I. (2005) Hepatits aguda inducida por *Camellia sinensis* (té verde). *Anales de Medicina Interna* 22(6), p.298.
- Wang, D.; Lu, J.; Miao, A.; Xie, Z.; Yang, D. (2008a) HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, pp. 361-369.
- Wang, H.; Helliwell, K. (2000a) Epimerisation of catechins in green tea infusions. *Food Chemistry*, 70, pp. 337-344.
- Wang, H.; Helliwell, K. (2001) Determination of flavonols in green tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*. 34, pp. 223-227.
- Wang, H.; Helliwell, K.; You, X. (2000) Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. *Food Chemistry*, 68, pp. 115-121.
- Wang, H.; Provan, G.J.; Helliwell, K. (2003) HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chemistry*, 81, pp. 307-312.
- Wang, H.; Provan, G.J.; Helliwell, K. (2004) Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87, pp. 307-311.
- Wang, H.F.; Tsai, Y.S.; Lin, M.L.; Ou, A.S-M. (2006) Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan, *Food Chemistry*, 96, pp. 648-653.
- Wang, L.; Xu, R.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Tu, Y.; Zeng, M. (2010) Analysis of free amino acids in Chinese teas and flower of tea plant by high performance liquid chromatography combined with solid-phase extraction. *Food Chemistry*, 123, pp. 1259-1266.
- Wang, L.F.; Lee, J.Y.; Chung, J.O.; Baik, J.H.; So, S.; Park, S.K. (2008) Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME–GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds. *Food Chemistry*, 109, pp. 196-206.
- Wang, L.F.; Park, S.C.; Chung, J. O.; Baik, J.H.; Park, S.K. (2004) The Compounds Contributing to the Greenness of Green Tea. *Journal of Food Science* 69 (8), pp. S301-S305.
- Wang, R.; Zhou, W.; Wen, R-A. H. (2006) Kinetic Study of the Thermal Stability of Tea Catechins in Aqueous Systems Using a Microwave Reactor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, pp. 5924-5932.
- Wang, R.; Zhou, W.; Jiang, X. (2008b) Reaction Kinetics of Degradation and Epimerization of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Aqueous System over a Wide Temperature Range. *J. Agric. Food Chem.* 56, pp. 2694–2701.
- Wang, X.C.; Chen, L.; Ma, C.L.; Yao, M.Z.; Yang, Y.J. (2010) Genotypic variation of beta-carotene and lutein contents in tea germplasms, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, pp. 9-14.

- Wang, Y.; Huang, S.; Shao, S.; Qian, L.; Xu, P. (2012) Studies on bioactivities of tea (*Camellia sinensis* L.) fruit peel extracts: Antioxidant activity and inhibitory potential against α -glucosidase and α -amylase in vitro. *Industrial Crops and Products* 37, pp. 520–526.
- Weber, J.M.; Ruzindana-Umunyana, A.; Imbeault, L.; Sircar, S. (2003) Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Research*, 58, pp. 167-173.
- Wei, K.; Wang, L.-Y.; Zhou, J.; He, W.; Zeng, J.-M.; Jiang, Y.-W.; Cheng, H. (2012) Comparison of catechins and purine alkaloids in albino and normal green tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) by HPLC. *Food Chemistry*, 130, pp. 720-724.
- Wei, K.; Wang, L.; Zhou, J.; He, W.; Zeng, J.; Jiang, Y.; Cheng, H. (2011) Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents. *Food Chemistry*, 125, pp. 44-48.
- Weinreb, O.; Mandel, S.; Amit, T.; Youdim, M.B.H. (2004) Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, pp. 506-516.
- Welna, M.; Szymczycha-Madeja, A.; Pohl, P. (2013) A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods. *Food Research International*, 53, pp. 922-930.
- Williamson, C.M.G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1), pp. 230S-242S.
- Wiseman, S.A.; Balentine, D.A.; Frei, B. (1997) Antioxidants in tea. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37 (8), pp. 705-718.
- Wu, C.; Xu, H.; Héritier, J.; Andlauer, W. (2012) Determination of catechins and flavonol glycosides in Chinese tea varieties. *Food Chemistry*, 132, pp. 144-149.
- Wu, S.-C.; Yen, G.C.; Wang, B.S.; Chiu, C.K.; Yen, W.J.; Chang, L.W.; Duh, P.D. (2007) Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea, *LWT - Food Science and Technology*, 40, pp. 506-512.
- Xu, R.; Ye, H.; Sun, Y.; Tu, Y.; Zeng X. (2012) Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology* 50 (7), pp. 2473-80.
- Yam, T.S.; Shah, S.; Hamilton-Miller, J.M.T. (1997) Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters*, 152, pp. 169-174.
- Yan, M.T.H.; Row, K.H. (2010) Solid-Phase Extraction of Caffeine and Theophylline from Green Tea by New Ionic Liquid-Modified Functional Polymer Sorbent. *Analytical Letters*, 43, pp. 110-118.
- Yang, D.-J.; Lucy Sun Hwang, L.S.; Lin, J.-T. (2007) Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. *Journal of Chromatography A* 1156, pp. 312–320.
- Yang, G.-Y.; Liu, Z.; Seril, D.N.; Liao, J.; Ding, W.; Kim, S.; Bondoc, F.; Yang, C.S. (1997a) Black tea constituents, theaflavins, inhibit 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1 butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis*, 18 (12), pp. 2361-2365.
- Yang, T.T.C.; Koo, M.W.L. (1997) Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacological Research*, 35 (6), pp. 505-512.
- Yang, Z.; Tu, Y.; Baldermann, S.; Dong, F.; Xu, Y.; Watanabe, N. (2009) Isolation and identification of compounds from the ethanolic extract of flowers of the tea (*Camellia sinensis*) plant and their contribution to the antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 42, pp. 1439-1443.

- Yao, L.; Jiang, Y.; Datta, N.; Singanusong, R.; Xu Liu, X.; Duan, J.; Raymont, K.; Lisle, A.; Xu, Y. (2004) HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry*, 84, pp. 253-263.
- Yashin, A.; Yashin, Y.; Nemzer, B. (2011) Determination of Antioxidant Activity in Tea Extracts, and Their Total Antioxidant Content. *American Journal of Biomedical. Science*, 3 (4), pp. 322-335.
- Yemane, M.; Chandravanshi, B.S.; Wondimu, T. (2008) Levels of essential and non-essential metals in leaves of the tea plant (*Camellia sinensis* L.) and soil of Wushwush farms, Ethiopia. *Food Chemistry*, 107, pp. 1236-1243.
- Yi, S-M.; Zhu, J-L.; Fu, L-L.; Li, J-R. (2010) Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. *International Journal of Food Microbiology*, 144 (1), pp. 111-117.
- Yin, J.; Becker, E.M.; Andersen, M.L.; Skibsted, L.H. (2012) Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with α -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. *Food Chemistry*, 135, pp. 2195-2202.
- Yoshida, Y.; Kiso, M.; Goto, T. (1999) Efficiency of the extraction of catechins from green tea. *Food Chemistry*, 67, pp. 429-433.
- Yuan, C.; Gao, E.; He, B.; Jiang, G. (2007) Arsenic species and leaching characters in tea (*Camellia sinensis*). *Food and Chemical Toxicology*, 45, pp. 2381-2389.
- Zamora, J.D. (2007) Antioxidantes Micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34 (1), pp. 17-26.
- Zandi, P.; Gordon, M.H. (1999) Antioxidant activity of extracts from old tea leaves. *Food Chemistry*, 64, pp. 285-288.
- Zepka, L.Q.; Mercadante, A.Z. (2009) Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*, 117, pp. 28-34.
- Zhang, H.; Zhou, W.; Zhang, W.; Yang, A.; Liu, Y.; Jiang, Y.; Huang, S.; Su, J. (2014) Inhibitory effects of citral, cinnamaldehyde, and tea polyphenols on mixed biofilm formation by foodborne staphylococcus aureus and salmonella enteritidis. *Journal of Food Protection* 77(6), pp.927-933.
- Zhang, Y.; Li, Q.; Xing, H.; Lu, X.; Zhao, L.; Qu, K.; Bi, K. (2013) Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC–DPPH assay. *Food Research International* 53, pp. 847–856.
- Zhao, W-H.; Hu, Z-Q.; Hara, Y.; Shimamura, T. (2002) Inhibition of Penicillinase by Epigallocatechin Gallate Resulting in Restoration of Antibacterial Activity of Penicillin against Penicillinase-Producing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (7), pp. 2266-2268.
- Zhao, W-H.; Hu, Z-Q.; Okubo, S.; Hara, Y.; Shimamura, T. (2001) Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (6), pp. 1737-1742.
- Zheng, W.; Wang, Y.S. (2001) Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, pp. 5165-5170.
- Zillich, O.V.; Schweiggert-Weisz, U.; Hasenkopf, K.; Eisner, P.; Kerscher, M. (2013) Release and in vitro skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, pp. 491-501.
- Zuo, Y.; Chen, H.; Deng, Y. (2002) Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57, pp. 307-316.

Webgrafia

Anónimo (2008) *Chá açores*

<http://ascameliasdasjaponeiras.com/index.php?link=artigo&codigo=1>

Anónimo (2011) *Chá dos Açores*

http://www.geocaching.com/seek/cache_details.aspx?guid=eaec6e11-8408-42fb-86f3-5397b12faa62 .

Arquivo Digital (sd), Vol I, p 535

<http://arquivodigital.uac.pt/aa/index.html>

Chá Gorreana. In: *Infopédia*, Porto Editora, Porto, 2003-2010. [Consultado a 2010-02-18].

[http://www.infopedia.pt/\\$cha-gorreana,2](http://www.infopedia.pt/$cha-gorreana,2)

CMRG (2012) *Chá*, Site Oficial da Câmara Municipal da Ribeira Grande

<http://cm-ribeiragrande.azoresdigital.pt/Default.aspx?Module=Artigo&ID=117>

Dias, F.S. (sd) Fonte Arquivo da família Eduardo Wallenstein. In: *Enciclopédia Açoreana*

(<http://pg.azores.gov.pt/drac/cca/enciclopedia/ver.aspx?id=1685>)

Enciclopédia Açoriana, Centro de Documentação Açoreana

<http://pg.azores.gov.pt/drac/cca/enciclopedia/ver.aspx?id=1685>

http://www.chaportoformoso.com/principal_portugues.php

FAO (2009a) Production of coffee and tea – Table B8. In: *FAO Statistical Yearbook 2009*.

<http://www.fao.org/economic/ess/publications-studies/statistical-yearbook/fao-statistical-yearbook-2009/b-agricultural-production/en/>

FAO (2009b) Value of imports and exports of tea – Table C15. In: *FAO Statistical Yearbook 2009*.

<http://www.fao.org/economic/ess/publications-studies/statistical-yearbook/fao-statistical-yearbook-2009/c-international-trade/en/>

FAO / WHO (1989) Report of the Conference of FAO

<http://www.fao.org/docrep/x5588e/x5588e00.htm>

Oliveira, C. (sd) *Plantações de Chá Gorreana*. Entrevista

<http://ajam.com.sapo.pt/index/revistas/setembro07/entrevista.pdf>

Tea Azores

<http://query.nytimes.com/mem/archivere/pdf?res=F70C12FD345B137B93C5AB178CD85F4D8784F9>

Anexos

Anexo I - Caracterização das folhas de chás verdes e pretos

Tabela A. 1 - Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de humidade das amostras de folhas de chá analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Teor de Humidade (%) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|----------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 7,0091 | 0,0201 | 0,29 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 7,9006 | 0,1948 | 2,47 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 7,0086 | 0,1687 | 2,41 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 8,0914 | 0,2468 | 3,05 |
| | Verde Tley | VC2 | 8,6505 | 0,1049 | 1,21 |
| | Verde Saludem | VC3 | 8,4227 | 0,1358 | 1,61 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 8,6470 | 0,4253 | 4,92 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 8,4744 | 0,2054 | 2,42 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 7,6228 | 0,2823 | 3,70 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 8,3182 | 0,1974 | 2,37 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 11,5900 | 0,1949 | 1,68 |
| | Gorreana-Moinha | PA4 | 8,7431 | 0,0640 | 0,73 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 7,2439 | 0,0848 | 1,17 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 8,9299 | 0,2103 | 2,36 |
| | English Breakfast | PC2 | 7,5291 | 0,0958 | 1,27 |
| | Earl Grey | PC3 | 7,7205 | 0,3183 | 4,12 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 8,4673 | 0,0734 | 0,87 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 8,4978 | 0,4239 | 4,99 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 8,8328 | 0,2696 | 3,05 |

Tabela A. 2 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de humidade das amostras de folhas de chá analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Cinzas (%) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 6,732 | 0,231 | 3,43 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 5,873 | 0,017 | 0,29 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 6,347 | 0,118 | 1,86 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 5,305 | 0,078 | 1,47 |
| | Verde Tley | VC2 | 5,265 | 0,045 | 0,85 |
| | Verde Salutem | VC3 | 5,625 | 0,133 | 2,37 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Salutem | VC4 | 6,389 | 0,204 | 3,19 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 5,607 | 0,203 | 3,61 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 6,009 | 0,239 | 3,98 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 5,753 | 0,018 | 0,31 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 5,293 | 0,167 | 3,16 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 5,516 | 0,055 | 1,00 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 4,978 | 0,059 | 1,19 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 5,369 | 0,152 | 2,83 |
| | English Breakfast | PC2 | 5,078 | 0,006 | 0,12 |
| | Earl Grey | PC3 | 5,436 | 0,231 | 4,26 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 6,185 | 0,021 | 0,34 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 5,261 | 0,049 | 0,93 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 6,958 | 0,171 | 2,46 |

Tabela A. 3 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de compostos fenólicos totais de extractos de acetona (50%) das amostras de folhas de chás analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Ác Gálico (mg/g chá seco) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|---------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 54,595 | 0,620 | 1,136 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 31,909 | 0,209 | 0,655 |
| | Gorreana-Hyson | VA3 | 50,976 | 1,241 | 2,435 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 56,262 | 1,255 | 2,231 |
| | Verde Tley | VC2 | 58,091 | 1,055 | 1,816 |
| | Verde Saludem | VC3 | 59,351 | 0,421 | 0,710 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 74,985 | 1,263 | 1,684 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 55,431 | 1,050 | 1,893 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 24,515 | 0,830 | 3,387 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 15,013 | 0,840 | 5,595 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 18,292 | 0,434 | 2,375 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 39,471 | 1,686 | 4,273 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 29,641 | 0,623 | 2,101 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 46,676 | 1,267 | 2,714 |
| | English Breakfast | PC2 | 59,025 | 0,417 | 0,707 |
| | Earl Grey | PC3 | 47,435 | 0,207 | 0,437 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 57,915 | 0,420 | 0,725 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 33,892 | 0,838 | 2,471 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 18,198 | 0,632 | 3,475 |

Tabela A. 4 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fósforo das amostras de chá folhas de chás analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Teor de P (g P /100g chá seco) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|--------------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 1,79 | 0,02 | 1,13 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 1,88 | 0,00 | 0,12 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 1,71 | 0,00 | 0,00 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 1,60 | 0,00 | 0,00 |
| | Verde Tley | VC2 | 1,97 | 0,01 | 0,70 |
| | Verde Saludem | VC3 | 1,77 | 0,01 | 0,44 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 1,82 | 0,01 | 0,43 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 1,44 | 0,00 | 0,00 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 2,62 | 0,01 | 0,30 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 2,36 | 0,02 | 0,66 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 1,92 | 0,00 | 0,00 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 1,99 | 0,01 | 0,70 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 2,38 | 0,02 | 1,03 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 1,67 | 0,01 | 0,47 |
| | English Breakfast | PC2 | 1,59 | 0,00 | 0,00 |
| | Earl Grey | PC3 | 1,71 | 0,01 | 0,70 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 2,08 | 0,00 | 0,00 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 1,48 | 0,01 | 0,70 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 1,98 | 0,00 | 0,00 |

Tabela A. 5 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fósforo das amostras de chá folhas de chás analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Teor de N (g N /100g chá seco) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|--------------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 3,42 | 0,02 | 0,70 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 3,34 | 0,04 | 1,34 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 2,92 | 0,00 | 0,00 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 3,26 | 0,00 | 0,00 |
| | Verde Tley | VC2 | 3,57 | 0,03 | 0,70 |
| | Verde Saludem | VC3 | 3,56 | 0,02 | 0,61 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 3,63 | 0,02 | 0,60 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 3,44 | 0,02 | 0,63 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 4,11 | 0,02 | 0,52 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 5,05 | 0,19 | 3,85 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 3,69 | 0,02 | 0,61 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 3,74 | 0,00 | 0,13 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 3,54 | 0,02 | 0,70 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 3,46 | 0,02 | 0,63 |
| | English Breakfast | PC2 | 3,45 | 0,00 | 0,00 |
| | Earl Grey | PC3 | 3,34 | 0,00 | 0,06 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 3,69 | 0,02 | 0,59 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 3,11 | 0,02 | 0,70 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 1,70 | 0,07 | 3,82 |

Tabela A. 6 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de proteína das amostras de folhas de chá analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Teor de N (g N /100g chá seco) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|--------------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 21,35 | 0,15 | 0,70 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 20,89 | 0,28 | 1,34 |
| | Gorreana-Hyson | VA3 | 18,25 | 0,00 | 0,00 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 20,37 | 0,00 | 0,00 |
| | Verde Tley | VC2 | 22,30 | 0,16 | 0,70 |
| | Verde Saludem | VC3 | 22,26 | 0,14 | 0,61 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 22,70 | 0,14 | 0,60 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 21,51 | 0,14 | 0,63 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 25,67 | 0,13 | 0,52 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 31,59 | 1,21 | 3,85 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 23,06 | 0,14 | 0,61 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 23,37 | 0,03 | 0,13 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 22,15 | 0,16 | 0,70 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 21,62 | 0,14 | 0,63 |
| | English Breakfast | PC2 | 21,57 | 0,00 | 0,00 |
| | Earl Grey | PC3 | 20,85 | 0,01 | 0,06 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 23,04 | 0,14 | 0,59 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 19,41 | 0,14 | 0,70 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 10,65 | 0,41 | 3,82 |

Tabela A. 7 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas amostras de folhas de chás analisadas

Tabela A. 8 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas amostras de folhas de chás analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg folha seca | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|----------------------------------|---------------|---------------------|--------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|
| | | Fe | | | Zn | | | Mg | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 11,171 | 0,318 | 2,850 | 16,166 | 0,101 | 0,622 | 580,828 | 11,018 | 1,897 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 20,190 | 0,616 | 3,052 | 16,195 | 0,337 | 2,078 | 456,051 | 1,984 | 0,435 |
| Gorreana-Hyson | VA3 | 14,519 | 0,314 | 2,161 | 10,404 | 0,145 | 1,394 | 571,266 | 5,282 | 0,925 |
| Verde Tetley | VC1 | 18,325 | 0,254 | 1,384 | 13,204 | 0,128 | 0,969 | 442,448 | 13,524 | 3,057 |
| Verde Tley | VC2 | 22,472 | 0,507 | 2,255 | 14,405 | 0,721 | 5,002 | 501,391 | 7,553 | 1,506 |
| Verde Saludem | VC3 | 31,511 | 0,067 | 0,213 | 15,017 | 0,147 | 0,981 | 533,381 | 1,535 | 0,288 |
| Verde+Gins Saludem | VC4 | 21,531 | 0,623 | 2,893 | 16,331 | 0,329 | 2,016 | 688,028 | 6,631 | 0,964 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 30,880 | 0,170 | 0,551 | 11,286 | 0,493 | 4,370 | 1206,085 | 30,972 | 2,568 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 51,634 | 0,319 | 0,617 | 15,185 | 0,092 | 0,606 | 417,337 | 2,415 | 0,579 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 6,515 | 0,287 | 4,405 | 14,281 | 0,160 | 1,121 | 374,253 | 21,958 | 5,867 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 14,120 | 0,584 | 4,134 | 9,621 | 0,005 | 0,055 | 234,137 | 7,804 | 3,333 |
| Gorreana-Moinha | PA4 | 22,488 | 0,705 | 3,136 | 13,580 | 0,490 | 3,607 | 50,556 | 0,159 | 0,315 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 43,529 | 2,159 | 4,960 | 15,870 | 0,084 | 0,530 | 224,348 | 0,285 | 0,127 |
| Li Cungo | PC1 | 7,270 | 0,051 | 0,704 | 13,718 | 0,255 | 1,862 | 47,185 | 2,549 | 5,402 |
| English Breakfast | PC2 | 21,262 | 0,694 | 3,263 | 13,365 | 0,117 | 0,872 | 232,990 | 1,703 | 0,731 |
| Earl Grey | PC3 | 89,070 | 1,527 | 1,714 | 10,105 | 0,080 | 0,796 | 179,862 | 12,444 | 6,919 |
| Preto - Tetley | PC4 | 9,982 | 0,294 | 2,944 | 9,757 | 0,191 | 1,958 | 62,302 | 0,332 | 0,532 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 32,952 | 0,098 | 0,298 | 12,197 | 0,469 | 3,843 | 184,895 | 2,901 | 1,569 |
| Preto+Canela-Laranja-Tley | PC6 | 19,363 | 0,399 | 2,060 | 11,695 | 0,103 | 0,881 | 42,193 | 0,543 | 1,287 |

Tabela A. 9 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Al, Ca e Na nas amostras de folhas de chás analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg folha seca | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|----------------------------------|---------------|---------------------|---------|---------------|---------------------|---------|---------------|---------------------|
| | | Al | | | Ca | | | Na | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 269,183 | 10,376 | 3,854 | 261,931 | 7,404 | 2,827 | 195,112 | 10,948 | 5,611 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 196,210 | 2,647 | 1,349 | 250,025 | 11,327 | 4,530 | 352,207 | 12,766 | 3,625 |
| Gorreana-Hyson | VA3 | 249,158 | 3,122 | 1,253 | 267,951 | 11,317 | 4,224 | 150,284 | 9,954 | 6,623 |
| Verde Tetley | VC1 | 377,077 | 1,146 | 0,304 | 248,349 | 13,754 | 5,538 | 494,250 | 10,622 | 2,149 |
| Verde Tley | VC2 | 284,322 | 16,649 | 5,856 | 392,889 | 21,880 | 5,569 | 261,787 | 5,951 | 2,273 |
| Verde Saludem | VC3 | 127,936 | 1,030 | 0,805 | 453,832 | 21,925 | 4,831 | 154,548 | 9,413 | 6,091 |
| Verde+Gins Saludem | VC4 | 627,781 | 52,703 | 8,395 | 346,750 | 22,801 | 6,576 | 159,859 | 8,305 | 5,195 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 364,064 | 14,925 | 4,099 | 629,670 | 36,334 | 5,770 | 287,584 | 7,617 | 2,649 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 220,260 | 0,241 | 0,109 | 245,450 | 15,068 | 6,139 | 285,426 | 9,958 | 3,489 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 155,343 | 2,839 | 1,827 | 263,514 | 4,510 | 1,712 | 186,485 | 7,177 | 3,849 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 186,339 | 6,573 | 3,528 | 223,007 | 1,493 | 0,669 | 207,762 | 19,761 | 9,511 |
| Gorreana-Moinha | PA4 | 363,683 | 4,709 | 1,295 | 234,941 | 0,836 | 0,356 | 610,173 | 23,764 | 3,895 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 269,387 | 6,294 | 2,336 | 261,001 | 13,637 | 5,225 | 118,901 | 11,274 | 9,482 |
| Li Cungo | PC1 | 596,595 | 8,287 | 1,389 | 281,931 | 6,362 | 2,257 | 455,088 | 17,923 | 3,938 |
| English Breakfast | PC2 | 301,864 | 5,067 | 1,679 | 327,581 | 7,320 | 2,235 | 24,320 | 0,341 | 1,403 |
| Earl Grey | PC3 | 252,707 | 3,772 | 1,493 | 205,588 | 7,919 | 3,852 | 486,138 | 28,970 | 5,959 |
| Preto - Tetley | PC4 | 494,998 | 5,453 | 1,102 | 354,541 | 3,978 | 1,122 | 398,803 | 15,675 | 3,930 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 272,814 | 1,204 | 0,441 | 322,257 | 6,969 | 2,162 | 489,740 | 40,204 | 8,209 |
| Preto+Canela-Laranja-Tley | PC6 | 567,252 | 9,338 | 1,646 | 335,829 | 16,411 | 4,887 | 709,229 | 9,465 | 1,335 |

Tabela A. 10 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de metal K nas amostras de folhas de chás analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg folha seca | | |
|---------------------------|---------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | K | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 8554,184 | 678,151 | 7,928 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 9240,231 | 182,980 | 1,980 |
| Gorreana-Hyson | VA3 | 11260,721 | 545,463 | 4,844 |
| Verde Tetley | VC1 | 12113,781 | 969,205 | 8,001 |
| Verde Tley | VC2 | 13602,397 | 1154,882 | 8,490 |
| Verde Salutem | VC3 | 12858,800 | 249,289 | 1,939 |
| Verde+Gins Salutem | VC4 | 13241,241 | 479,308 | 3,620 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 13308,210 | 0,000 | 13,306 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 9716,050 | 317,788 | 3,271 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 8403,890 | 1008,098 | 11,996 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 9884,777 | 577,785 | 5,845 |
| Gorreana-Moínha | PA4 | 9753,739 | 118,065 | 1,210 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 8070,072 | 1061,173 | 13,149 |
| Li Cungo | PC1 | 14164,404 | 92,276 | 0,651 |
| English Breakfast | PC2 | 12333,218 | 297,214 | 2,410 |
| Earl Grey | PC3 | 11545,366 | 63,105 | 0,547 |
| Preto - Tetley | PC4 | 13339,720 | 133,582 | 1,001 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 10927,103 | 489,468 | 4,479 |
| Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 8368,870 | 464,802 | 5,554 |

Anexo II - Caracterização das infusões (5 min, 15 min): Peso seco, Extracto Aquoso, Teor de Cinzas,

Tabela A. 11 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de peso seco das infusões de 5 minutos analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Extrato seco (% mg/mL) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 242,24 | 6,4488 | 2,662 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 181,82 | 0,0011 | 0,001 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 215,82 | 0,0035 | 0,002 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 259,30 | 0,4808 | 0,185 |
| | Verde Tley | VC2 | 312,98 | 0,0008 | 0,000 |
| | Verde Saludem | VC3 | 357,08 | 0,0016 | 0,000 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 378,12 | 0,0016 | 0,000 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 267,32 | 0,0021 | 0,001 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 157,10 | 0,0030 | 0,002 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 141,24 | 0,0023 | 0,002 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 148,98 | 0,0018 | 0,001 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 196,82 | 0,0035 | 0,002 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 191,92 | 0,0017 | 0,001 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 226,44 | 1,5839 | 0,699 |
| | English Breakfast | PC2 | 280,40 | 0,0011 | 0,000 |
| | Earl Grey | PC3 | 334,38 | 0,0003 | 0,000 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 257,90 | 0,0042 | 0,002 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 294,38 | 0,0027 | 0,001 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 272,16 | 0,6788 | 0,249 |

Tabela A. 12 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de peso seco das infusões de 15 minutos analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Extrato seco (% mg/mL) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 243,76 | 1,0748 | 0,441 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 238,96 | 3,5638 | 1,491 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 248,50 | 3,8749 | 1,559 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 282,02 | 0,0015 | 0,001 |
| | Verde Tley | VC2 | 328,42 | 4,3841 | 1,335 |
| | Verde Saludem | VC3 | 443,88 | 7,4670 | 1,682 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 415,10 | 5,2326 | 1,261 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 281,92 | 1,1314 | 0,401 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 200,32 | 1,5839 | 0,791 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 163,70 | 3,1961 | 1,952 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 172,44 | 6,6751 | 3,871 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 275,92 | 0,6223 | 0,226 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 225,82 | 0,7071 | 0,313 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 237,46 | 0,0040 | 0,002 |
| | English Breakfast | PC2 | 301,02 | 0,0849 | 0,028 |
| | Earl Grey | PC3 | 409,62 | 1,2162 | 0,297 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 281,82 | 2,1779 | 0,773 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 303,46 | 0,8768 | 0,289 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 273,76 | 0,0011 | 0,000 |

Tabela A. 13 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de peso seco das infusões do extractos aquosos analisados

| Tipo de chá | Variedade | Código | Extrato seco (% mg/mL) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 135,60 | 4,525 | 3,34 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 146,50 | 3,818 | 2,61 |
| | Gorreana-Hyson | VA3 | 141,00 | 2,828 | 2,01 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 138,10 | 0,141 | 0,10 |
| | Verde Tley | VC2 | 152,70 | 0,990 | 0,65 |
| | Verde Saludem | VC3 | 155,20 | 2,828 | 1,82 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 114,80 | 0,566 | 0,49 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 146,70 | 1,556 | 1,06 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 119,80 | 0,000 | 0,00 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 120,00 | 2,828 | 2,36 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 110,40 | 0,283 | 0,26 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 124,60 | 5,374 | 4,31 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 105,30 | 2,404 | 2,28 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 128,80 | 3,111 | 2,42 |
| | English Breakfast | PC2 | 108,20 | 1,697 | 1,57 |
| | Earl Grey | PC3 | 168,90 | 5,515 | 3,27 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 127,40 | 1,697 | 1,33 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 147,00 | 0,849 | 0,58 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 108,20 | 0,849 | 0,78 |

Tabela A. 14 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinzas das infusões de 5 minutos analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Cinzas (% mg/mL) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 38,540 | 0,141 | 0,367 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 31,260 | 0,424 | 1,357 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 40,840 | 1,414 | 3,463 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 26,060 | 0,594 | 2,279 |
| | Verde Tley | VC2 | 34,620 | 0,311 | 0,899 |
| | Verde Saludem | VC3 | 32,800 | 0,622 | 1,897 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 65,780 | 0,651 | 0,989 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 47,000 | 0,849 | 1,805 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 25,980 | 1,216 | 4,681 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 22,420 | 0,933 | 4,163 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 25,300 | 0,707 | 2,795 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 29,500 | 1,386 | 4,698 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 29,840 | 0,679 | 2,275 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 36,120 | 1,584 | 4,385 |
| | English Breakfast | PC2 | 45,560 | 0,453 | 0,993 |
| | Earl Grey | PC3 | 66,560 | 0,113 | 0,170 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 35,920 | 1,697 | 4,725 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 37,440 | 1,075 | 2,871 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 26,000 | 0,453 | 1,741 |

Tabela A. 15 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de cinzas das infusões de 15 minutos analisadas

| Tipo de chá | Variedade | Código | Cinzas (% mg/mL) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 88,35 | 0,7778 | 0,880 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 81,10 | 1,6971 | 2,093 |
| | Gorreana-Hyson | VA3 | 82,90 | 4,1012 | 4,947 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 50,10 | 1,4142 | 2,823 |
| | Verde Tley | VC2 | 87,25 | 0,0707 | 0,081 |
| | Verde Saludem | VC3 | 81,05 | 0,4950 | 0,611 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 178,00 | 0,2828 | 0,159 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 115,55 | 4,7376 | 4,100 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 80,50 | 2,8284 | 3,514 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 74,15 | 2,3335 | 3,147 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 77,10 | 3,3941 | 4,402 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 71,30 | 2,6870 | 3,769 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 81,90 | 0,8485 | 1,036 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 77,60 | 0,8485 | 1,093 |
| | English Breakfast | PC2 | 124,80 | 4,2426 | 3,400 |
| | Earl Grey | PC3 | 142,50 | 2,9698 | 2,084 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 91,15 | 3,0406 | 3,336 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 81,90 | 0,8485 | 1,036 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 62,45 | 0,4950 | 0,793 |

Tabela A. 16 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas infusões de 5 minutos analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg extracto seco | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|-------------------------------------|---------------|---------------------|--------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|
| | | Fe | | | Zn | | | Mg | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 42,663 | 0,972 | 2,279 | 61,743 | 0,736 | 1,193 | 2218,491 | 54,745 | 2,468 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 102,433 | 2,957 | 2,887 | 82,167 | 1,572 | 1,913 | 2313,845 | 13,897 | 0,601 |
| Gorreana-Hyson | VA3 | 62,664 | 0,547 | 0,872 | 44,905 | 0,047 | 0,105 | 2466,088 | 54,576 | 2,213 |
| Verde Tetley | VC1 | 59,899 | 1,567 | 2,617 | 43,154 | 0,114 | 0,264 | 1445,839 | 26,371 | 1,824 |
| Verde Tley | VC2 | 65,676 | 1,648 | 2,509 | 42,094 | 1,999 | 4,749 | 1465,257 | 18,347 | 1,252 |
| Verde Saludem | VC3 | 80,932 | 1,282 | 1,584 | 38,573 | 1,071 | 2,778 | 1369,986 | 28,561 | 2,085 |
| Verde+Gins Saludem | VC4 | 52,098 | 2,525 | 4,846 | 39,498 | 0,024 | 0,061 | 1664,502 | 48,579 | 2,919 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 105,989 | 5,057 | 4,772 | 38,768 | 3,327 | 8,583 | 4136,912 | 68,422 | 1,654 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 304,338 | 12,698 | 4,172 | 89,482 | 2,640 | 2,951 | 2459,327 | 73,230 | 2,978 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 42,338 | 0,287 | 0,679 | 92,865 | 2,421 | 2,607 | 2431,425 | 52,090 | 2,142 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 83,876 | 3,474 | 4,141 | 57,149 | 0,027 | 0,047 | 1390,786 | 46,250 | 3,325 |
| Gorreana-Moinha | PA4 | 104,552 | 7,305 | 6,987 | 63,056 | 0,156 | 0,248 | 234,923 | 9,796 | 4,170 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 210,776 | 11,953 | 5,671 | 76,832 | 0,955 | 1,242 | 1086,149 | 6,355 | 0,585 |
| Li Cungo | PC1 | 27,934 | 1,043 | 3,735 | 52,722 | 2,579 | 4,892 | 181,143 | 4,298 | 2,373 |
| English Breakfast | PC2 | 70,188 | 0,144 | 0,205 | 44,136 | 1,146 | 2,596 | 769,647 | 32,313 | 4,198 |
| Earl Grey | PC3 | 245,917 | 4,209 | 1,712 | 27,899 | 0,223 | 0,799 | 496,586 | 34,343 | 6,916 |
| Preto - Tetley | PC4 | 35,466 | 0,146 | 0,412 | 34,695 | 1,843 | 5,312 | 221,447 | 6,253 | 2,824 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 102,585 | 2,363 | 2,304 | 37,993 | 2,447 | 6,441 | 575,757 | 24,009 | 4,170 |
| Preto+Canela-Laranja-Tley | PC6 | 64,560 | 0,664 | 1,028 | 38,994 | 0,059 | 0,151 | 140,687 | 0,358 | 0,254 |

Tabela A. 17 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Al, Ca e Na nas infusões de 5 minutos analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg extracto seco | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|-------------------------------------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|
| | | Al | | | Ca | | | Na | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 1027,986 | 33,758 | 3,284 | 1000,319 | 22,567 | 2,256 | 745,076 | 37,558 | 5,041 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 995,510 | 15,078 | 1,515 | 1268,489 | 55,370 | 4,365 | 1787,022 | 67,728 | 3,790 |
| Gorreana-Hyson | VA3 | 1075,436 | 0,383 | 0,036 | 1156,958 | 63,756 | 5,511 | 648,996 | 51,327 | 7,909 |
| Verde Tetley | VC1 | 1232,428 | 11,449 | 0,929 | 811,436 | 34,946 | 4,307 | 1615,637 | 54,635 | 3,382 |
| Verde Tley | VC2 | 830,852 | 46,544 | 5,602 | 1148,115 | 61,025 | 5,315 | 765,078 | 19,337 | 2,527 |
| Verde Salutesm | VC3 | 328,570 | 3,258 | 0,992 | 1166,141 | 77,260 | 6,625 | 396,728 | 17,043 | 4,296 |
| Verde+Gins Salutesm | VC4 | 1519,853 | 157,178 | 10,342 | 839,329 | 71,555 | 8,525 | 386,896 | 27,650 | 7,147 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 1248,348 | 1,519 | 0,122 | 2158,329 | 33,481 | 1,551 | 986,406 | 15,519 | 1,573 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 1298,081 | 44,742 | 3,447 | 1448,139 | 140,246 | 9,685 | 1681,115 | 1,128 | 0,067 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 1009,983 | 19,192 | 1,900 | 1714,405 | 93,210 | 5,437 | 1213,743 | 91,884 | 7,570 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 1106,864 | 39,130 | 3,535 | 1324,674 | 8,767 | 0,662 | 1234,114 | 117,285 | 9,504 |
| Gorreana-Moinha | PA4 | 1690,293 | 87,024 | 5,148 | 1091,588 | 38,200 | 3,499 | 2837,324 | 219,715 | 7,744 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 1304,312 | 39,759 | 3,048 | 1263,371 | 57,025 | 4,514 | 575,838 | 58,683 | 10,191 |
| Li Cungo | PC1 | 2291,703 | 37,645 | 1,643 | 1082,838 | 8,392 | 0,775 | 1749,543 | 121,867 | 6,966 |
| English Breakfast | PC2 | 996,747 | 17,841 | 1,790 | 1082,395 | 61,700 | 5,700 | 80,307 | 1,659 | 2,066 |
| Earl Grey | PC3 | 697,708 | 10,396 | 1,490 | 567,615 | 21,849 | 3,849 | 1342,196 | 80,022 | 5,962 |
| Preto - Tetley | PC4 | 1759,905 | 78,436 | 4,457 | 1260,055 | 28,157 | 2,235 | 1416,696 | 8,142 | 0,575 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 849,310 | 18,348 | 2,160 | 1003,573 | 47,796 | 4,763 | 1526,351 | 164,835 | 10,799 |
| Preto+Canela-Laranja-Tley | PC6 | 1891,694 | 50,666 | 2,678 | 1119,558 | 43,164 | 3,855 | 2365,129 | 55,976 | 2,367 |

Tabela A. 18 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de metal K nas infusões de 5 minutos analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg extracto seco | | |
|---------------------------|---------|-------------------------------------|---------------|---------------------|
| | | K | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 32678,627 | 2776,594 | 8,497 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 46882,311 | 1006,019 | 2,146 |
| Gorreana-Hyson | VA3 | 42563,060 | 1319,608 | 3,100 |
| Verde Tetley | VC1 | 28431,981 | 690,919 | 2,430 |
| Verde Tley | VC2 | 30841,847 | 559,158 | 1,813 |
| Verde Salutem | VC3 | 25581,167 | 1971,217 | 7,706 |
| Verde+Gins Salutem | VC4 | 26226,332 | 321,557 | 1,226 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 45659,395 | 1410,509 | 3,089 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 51360,235 | 2853,836 | 5,557 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 54535,471 | 4519,390 | 8,287 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 54644,794 | 1318,595 | 2,413 |
| Gorreana-Moínha | PA4 | 45331,767 | 2295,695 | 5,064 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 39069,809 | 888,442 | 2,274 |
| Li Cungo | PC1 | 46869,964 | 393,583 | 0,840 |
| English Breakfast | PC2 | 40752,795 | 2394,376 | 5,875 |
| Earl Grey | PC3 | 31875,987 | 173,351 | 0,544 |
| Preto - Tetley | PC4 | 41722,583 | 2798,444 | 6,707 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 30800,466 | 2376,590 | 7,716 |
| Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 27605,250 | 514,555 | 1,864 |

Tabela A. 19 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Fe, Zn e Mg nas infusões de 15 minutos analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg extracto seco | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|-------------------------------------|---------------|---------------------|--------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|
| | | Fe | | | Zn | | | Mg | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 158,449 | 2,379 | 1,502 | 95,744 | 4,067 | 4,248 | 3054,907 | 83,954 | 2,748 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 106,241 | 4,188 | 3,942 | 74,477 | 1,671 | 2,243 | 2435,035 | 97,731 | 4,014 |
| Gorreana-Hyson | VA3 | 139,941 | 2,751 | 1,966 | 65,637 | 3,044 | 4,637 | 2274,070 | 80,704 | 3,549 |
| Verde Tetley | VC1 | 76,281 | 1,222 | 1,602 | 64,751 | 0,425 | 0,657 | 1617,269 | 32,178 | 1,990 |
| Verde Tley | VC2 | 139,827 | 0,919 | 0,657 | 41,889 | 1,011 | 2,414 | 1534,807 | 50,846 | 3,313 |
| Verde Saludem | VC3 | 1501,176 | 15,528 | 1,034 | 34,154 | 1,355 | 3,968 | 1344,443 | 45,875 | 3,412 |
| Verde+Gins Saludem | VC4 | 248,952 | 3,846 | 1,545 | 37,872 | 0,205 | 0,541 | 1729,644 | 9,540 | 0,552 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 535,634 | 10,677 | 1,993 | 40,666 | 0,865 | 2,127 | 5454,602 | 108,673 | 1,992 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 1296,059 | 33,545 | 2,588 | 73,028 | 1,258 | 1,723 | 2075,117 | 110,303 | 5,315 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 198,981 | 5,138 | 2,582 | 89,911 | 1,009 | 1,122 | 2064,588 | 77,026 | 3,731 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 74,198 | 5,308 | 7,154 | 54,353 | 1,222 | 2,249 | 1558,628 | 80,837 | 5,186 |
| Gorreana-Moinha | PA4 | 665,222 | 5,932 | 0,892 | 45,393 | 0,180 | 0,395 | 1706,309 | 15,637 | 0,916 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 692,697 | 0,179 | 0,026 | 69,835 | 0,093 | 0,134 | 1206,037 | 7,809 | 0,648 |
| Li Cungo | PC1 | 1545,263 | 62,271 | 4,030 | 67,746 | 0,411 | 0,607 | 1743,698 | 72,116 | 4,136 |
| English Breakfast | PC2 | 110,242 | 0,838 | 0,760 | 59,847 | 0,134 | 0,224 | 1670,488 | 5,874 | 0,352 |
| Earl Grey | PC3 | 790,136 | 8,733 | 1,105 | 31,214 | 1,318 | 4,224 | 757,181 | 10,362 | 1,368 |
| Preto - Tetley | PC4 | 359,251 | 5,504 | 1,532 | 31,929 | 1,545 | 4,838 | 2227,902 | 29,953 | 1,344 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 122,394 | 3,756 | 3,069 | 40,153 | 0,420 | 1,046 | 1158,644 | 4,746 | 0,410 |
| Preto+Canela-Laranja-Tley | PC6 | 239,088 | 0,181 | 0,076 | 59,468 | 0,501 | 0,843 | 1936,461 | 80,176 | 4,140 |

Tabela A. 20 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de metais Al, Ca e Na nas infusões de 15 minutos analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg extracto seco | | | | | | | | |
|---------------------------|---------|-------------------------------------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|----------|---------------|---------------------|
| | | Al | | | Ca | | | Na | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 1870,302 | 112,258 | 6,002 | 1254,479 | 26,391 | 2,104 | 2009,675 | 22,851 | 1,137 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 990,261 | 74,542 | 7,528 | 965,911 | 36,007 | 3,728 | 4233,738 | 221,157 | 5,224 |
| Gorreana-Hysson | VA3 | 1607,137 | 13,638 | 0,849 | 1125,646 | 11,862 | 1,054 | 2262,372 | 77,107 | 3,408 |
| Verde Tetley | VC1 | 2370,074 | 42,300 | 1,785 | 1309,981 | 90,834 | 6,934 | 1850,969 | 108,858 | 5,881 |
| Verde Tley | VC2 | 1549,536 | 23,453 | 1,514 | 1511,186 | 1,656 | 0,110 | 1052,103 | 31,170 | 2,963 |
| Verde Saludem | VC3 | 1014,876 | 35,711 | 3,519 | 944,851 | 13,258 | 1,403 | 1674,142 | 41,018 | 2,450 |
| Verde+Gins Saludem | VC4 | 1483,226 | 109,662 | 7,393 | 982,535 | 18,958 | 1,930 | 945,092 | 27,705 | 2,931 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 1148,108 | 45,055 | 3,924 | 4464,224 | 95,669 | 2,143 | 3974,686 | 182,695 | 4,596 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 1479,475 | 39,838 | 2,693 | 1384,576 | 52,590 | 3,798 | 2352,209 | 93,997 | 3,996 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 1318,857 | 1,895 | 0,144 | 1459,832 | 46,644 | 3,195 | 4715,675 | 35,052 | 0,743 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 1777,144 | 120,050 | 6,755 | 1336,372 | 13,185 | 0,987 | 4041,859 | 203,206 | 5,028 |
| Gorreana-Moinha | PA4 | 2191,527 | 44,262 | 2,020 | 902,227 | 24,361 | 2,700 | 2552,431 | 54,192 | 2,123 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 1896,237 | 23,473 | 1,238 | 1320,429 | 58,491 | 4,430 | 3412,267 | 61,836 | 1,812 |
| Li Cungo | PC1 | 2385,049 | 25,739 | 1,079 | 1377,793 | 15,969 | 1,159 | 3320,592 | 145,013 | 4,367 |
| English Breakfast | PC2 | 1210,553 | 13,026 | 1,076 | 1325,324 | 26,171 | 1,975 | 1260,711 | 17,967 | 1,425 |
| Earl Grey | PC3 | 599,681 | 13,928 | 2,323 | 660,358 | 7,016 | 1,062 | 1536,081 | 15,609 | 1,016 |
| Preto - Tetley | PC4 | 1868,427 | 36,746 | 1,967 | 1604,409 | 41,797 | 2,605 | 1916,721 | 119,172 | 6,218 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 1066,180 | 16,260 | 1,525 | 1202,200 | 44,484 | 3,700 | 2133,842 | 35,805 | 1,678 |
| Preto+Canela-Laranja-Tley | PC6 | 1957,656 | 160,098 | 8,178 | 2009,947 | 66,955 | 3,331 | 2787,260 | 90,352 | 3,242 |

Tabela A. 21 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do teor de metal K nas infusões de 15 minutos analisadas

| Variedade | Códigos | Concentração em mg/Kg extracto seco | | |
|---------------------------|---------|-------------------------------------|---------------|---------------------|
| | | K | | |
| | | Média | Desvio Padrão | Desvio Relativo (%) |
| Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 44736,096 | 1032,190 | 2,307 |
| Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 42524,525 | 1312,883 | 3,087 |
| Gorreana-Hysson | VA3 | 42232,056 | 2666,324 | 6,314 |
| Verde Tetley | VC1 | 43053,717 | 1159,995 | 2,694 |
| Verde Tley | VC2 | 37886,387 | 1161,995 | 3,067 |
| Verde Saludem | VC3 | 26563,575 | 83,137 | 0,313 |
| Verde+Gins Saludem | VC4 | 29167,103 | 682,515 | 2,340 |
| Verde+Menta Lipton | VC5 | 44214,764 | 1460,624 | 3,303 |
| Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 44886,076 | 1867,115 | 4,160 |
| Gorreana-Pekoe | PA2 | 60308,089 | 666,967 | 1,106 |
| Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 50708,570 | 1007,972 | 1,988 |
| Gorreana-Moínha | PA4 | 39994,541 | 2229,557 | 5,575 |
| Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 48173,062 | 1246,793 | 2,588 |
| Li Cungo | PC1 | 57043,128 | 58,009 | 0,102 |
| English Breakfast | PC2 | 37543,974 | 301,839 | 0,804 |
| Earl Grey | PC3 | 27282,813 | 141,426 | 0,518 |
| Preto - Tetley | PC4 | 43370,019 | 56,254 | 0,130 |
| Preto+Limão-Lipton | PC5 | 32992,774 | 1567,516 | 4,751 |
| Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 28071,262 | 1634,505 | 5,823 |

Anexo III – Determinação de Fenólicos totais

Tabela A. 22 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de infusões de 5 minutos de chás verdes, chás pretos, chás vermelhos e tisanas analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|-------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 507,073 | 5,794 | 1,143 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 403,614 | 8,75 | 2,168 |
| | Gorreana-Hyson | VA3 | 541,859 | 12,526 | 2,312 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 831,611 | 2,289 | 0,275 |
| | Verde Tley | VC2 | 773,645 | 10,477 | 1,354 |
| | Verde Saludem | VC3 | 755,496 | 1,17 | 0,155 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 825,94 | 0 | 0 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 771,997 | 11,647 | 1,509 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 212,731 | 2,952 | 1,388 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 179,299 | 0,986 | 0,55 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 129,021 | 2,967 | 2,3 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 327,814 | 4,884 | 1,49 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 299,55 | 2,616 | 0,873 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 510,35 | 6,647 | 1,302 |
| | English Breakfast | PC2 | 558,287 | 22,207 | 3,978 |
| | Earl Grey | PC3 | 183,575 | 2,157 | 1,175 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 653,531 | 5,416 | 0,829 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 668,812 | 10,187 | 1,523 |
| | Preto+Canela+ Laranja-Tley | PC6 | 381,79 | 6,44 | 1,687 |
| Chás vermelho | Red Tea - Lipton | V1 | 426,179 | 10,196 | 2,392 |
| | Rooibos - Diese | V2 | 323,554 | 17,622 | 5,446 |
| | Rooibos Orange - Tetley | V3 | 281,370 | 9,225 | 3,278 |
| | Vermelho - Erva Pura | V4 | 144,800 | 0,000 | 0,000 |
| Tisanas | Tilia - Tetley | T1 | 200,047 | 3,354 | 1,676 |
| | Melissa – Cidreira - Tetley | T2 | 640,741 | 9,057 | 1,413 |
| | Menta - Tetley | T3 | 416,260 | 1,278 | 0,307 |
| | Morroco - Menta - Lipton | T4 | 213,307 | 4,682 | 2,195 |
| | Camomila - Tley | T5 | 77,044 | 0,688 | 0,893 |
| | Verbena - Lúcia-Lima - Lipton | T6 | 380,857 | 20,611 | 5,412 |

Tabela A. 23 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 796,80 | 5,86 | 0,74 |
| | Gorreana-Folha enrolada-Moída | VA1.1 | 864,98 | 6,75 | 0,78 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 526,98 | 2,00 | 0,38 |
| | Gorreana-Encosta de bruma-Moída | VA2.1 | 843,00 | 5,41 | 0,64 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 761,68 | 2,39 | 0,31 |
| | Gorreana-Hysson-Moída | VA3.1 | 963,21 | 8,08 | 0,84 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 817,81 | 1,74 | 0,21 |
| | Verde Tley | VC2 | 865,84 | 14,64 | 1,69 |
| | Verde Salutem | VC3 | 895,07 | 5,53 | 0,62 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Salutem | VC4 | 751,94 | 5,40 | 0,72 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 942,48 | 3,76 | 0,40 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 192,65 | 1,93 | 1,00 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 250,53 | 6,74 | 2,69 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 152,47 | 2,89 | 1,90 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 350,65 | 0,00 | 0,00 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 275,05 | 0,96 | 0,35 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 444,63 | 3,85 | 0,87 |
| | English Breakfast | PC2 | 564,49 | 3,85 | 0,68 |
| | Earl Grey | PC3 | 618,29 | 6,74 | 1,09 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 492,30 | 5,78 | 1,17 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 329,53 | 0,96 | 0,29 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 259,39 | 3,85 | 1,49 |

Tabela A. 24 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 959,46 | 5,31 | 0,55 |
| | Gorreana-Folha enrolada-Moída | VA1.1 | 950,83 | 9,43 | 0,99 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 732,75 | 3,64 | 0,50 |
| | Gorreana-Encosta de bruma-Moída | VA2.1 | 898,39 | 0,00 | 0,00 |
| | Gorreana-Hyson | VA3 | 909,87 | 1,10 | 0,12 |
| | Gorreana-Hyson-Moída | VA3.1 | 1031,69 | 8,06 | 0,78 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 814,11 | 9,28 | 1,14 |
| | Verde Tley | VC2 | 896,64 | 4,42 | 0,49 |
| | Verde Saludem | VC3 | 983,29 | 1,04 | 0,11 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 781,83 | 1,18 | 0,15 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 991,74 | 8,83 | 0,89 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 326,13 | 5,78 | 1,77 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 287,99 | 3,85 | 1,34 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 187,20 | 1,93 | 1,03 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 413,30 | 1,93 | 0,47 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 347,24 | 0,96 | 0,28 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 470,51 | 1,93 | 0,41 |
| | English Breakfast | PC2 | 635,32 | 0,00 | 0,00 |
| | Earl Grey | PC3 | 720,45 | 4,82 | 0,67 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 516,82 | 5,78 | 1,12 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 452,12 | 0,96 | 0,21 |
| | Preto+Canela+ Laranja-Tley | PC6 | 296,84 | 2,89 | 0,97 |

Tabela A. 25 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação dos teores de fenólicos totais de extractos aquosos de chás verdes e chás pretos analisados

| Tipo de chá | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L) | | |
|----------------------------|---------------------------|--------|--------------------------|---------------|-----------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 312,97 | 2,09 | 0,67 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 139,66 | 1,08 | 0,77 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 314,44 | 10,43 | 3,32 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 152,61 | 2,15 | 1,41 |
| | Verde Tley | VC2 | 324,02 | 5,21 | 1,61 |
| | Verde Saludem | VC3 | 313,70 | 1,04 | 0,33 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 117,50 | 4,33 | 3,69 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 215,38 | 3,19 | 1,48 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 158,69 | 4,30 | 2,71 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 79,86 | 3,27 | 4,10 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 59,78 | 3,28 | 5,49 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 103,70 | 6,51 | 6,28 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 116,73 | 5,41 | 4,64 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 189,76 | 3,21 | 1,69 |
| | English Breakfast | PC2 | 143,47 | 4,31 | 3,00 |
| | Earl Grey | PC3 | 157,17 | 6,45 | 4,10 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 77,54 | 4,36 | 5,63 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 109,84 | 6,51 | 5,92 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 102,93 | 3,26 | 3,16 |

Anexo IV – Determinação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH'

Tabela A. 26 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 5 minutos de chás verdes, chás pretos, chás vermelhos e tisanas analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|-------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 156,050 | 0,942 | 0,603 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 155,918 | 5,152 | 3,304 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 197,327 | 2,986 | 1,513 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 591,840 | 1,570 | 0,265 |
| | Verde Tley | VC2 | 601,290 | 21,128 | 3,514 |
| | Verde Salutem | VC3 | 669,975 | 4,052 | 0,605 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Salutem | VC4 | 559,459 | 3,178 | 0,568 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 835,615 | 19,045 | 2,279 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 58,750 | 2,131 | 3,628 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 58,862 | 2,536 | 4,308 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 14,768 | 0,499 | 3,377 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 35,244 | 1,408 | 3,996 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 42,887 | 0,701 | 1,635 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 83,760 | 4,013 | 4,791 |
| | English Breakfast | PC2 | 361,560 | 5,388 | 1,490 |
| | Earl Grey | PC3 | 122,955 | 0,818 | 0,666 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 410,466 | 2,180 | 0,531 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 417,540 | 4,921 | 1,179 |
| | Preto+Canela+ Laranja-Tley | PC6 | 148,011 | 3,375 | 2,280 |
| Chás vermelho | Red Tea - Lipton | V1 | 252,990 | 4,327 | 1,711 |
| | Rooibos - Diese | V2 | 90,941 | 4,226 | 4,647 |
| | Rooibos Orange - Tetley | V3 | 90,941 | 4,226 | 4,647 |
| | Vermelho - Erva Pura | V4 | 19,585 | 0,604 | 3,084 |
| Tisanas | Tilia - Tetley | T1 | 64,467 | 3,070 | 4,762 |
| | Melissa – Cidreira - Tetley | T2 | 236,445 | 6,725 | 2,844 |
| | Menta - Tetley | T3 | 177,480 | 2,885 | 1,626 |
| | Morroco - Menta - Lipton | T4 | 59,775 | 1,526 | 2,553 |
| | Camomila - Tley | T5 | 128,730 | 0,552 | 0,428 |
| | Verbena - Lúcia-Lima - Lipton | T6 | 191,505 | 1,761 | 0,919 |

Tabela A. 27 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 509,03 | 0,57 | 0,11 |
| | Gorreana-Folha enrolada-Moída | VA1.1 | 621,74 | 0,28 | 0,05 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 328,46 | 1,46 | 0,44 |
| | Gorreana-Encosta de bruma-Moída | VA2.1 | 540,11 | 1,71 | 0,32 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 492,45 | 1,15 | 0,23 |
| | Gorreana-Hysson-Moída | VA3.1 | 621,94 | 0,56 | 0,09 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 547,56 | 0,85 | 0,16 |
| | Verde Tley | VC2 | 570,08 | 0,28 | 0,05 |
| | Verde Salutem | VC3 | 580,51 | 1,42 | 0,24 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Salutem | VC4 | 456,97 | 0,71 | 0,16 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 519,95 | 0,47 | 0,09 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 136,66 | 0,74 | 0,54 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 209,80 | 0,49 | 0,23 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 165,92 | 1,23 | 0,74 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 232,94 | 0,49 | 0,21 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 198,72 | 1,47 | 0,74 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 305,92 | 0,24 | 0,08 |
| | English Breakfast | PC2 | 375,54 | 1,44 | 0,38 |
| | Earl Grey | PC3 | 391,11 | 0,48 | 0,12 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 319,76 | 0,97 | 0,30 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 256,88 | 1,70 | 0,66 |
| | Preto+Canela+ Laranja-Tley | PC6 | 173,05 | 0,49 | 0,28 |

Tabela A. 28 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação da capacidade antioxidante determinada pelo método do radical DPPH• de infusões de 30 minutos de chás verdes e chás pretos analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 610,42 | 2,00 | 0,33 |
| | Gorreana-Folha enrolada-Moída | VA1.1 | 641,50 | 1,13 | 0,18 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 428,88 | 1,69 | 0,39 |
| | Gorreana-Encosta de bruma-Moída | VA2.1 | 583,95 | 0,57 | 0,10 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 433,43 | 0,68 | 0,16 |
| | Gorreana-Hysson-Moída | VA3.1 | 606,17 | 1,98 | 0,33 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 613,48 | 1,00 | 0,16 |
| | Verde Tley | VC2 | 614,66 | 2,00 | 0,32 |
| | Verde Saludem | VC3 | 562,77 | 2,67 | 0,48 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 499,48 | 1,68 | 0,34 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 665,13 | 0,33 | 0,05 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 140,37 | 2,08 | 1,48 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 167,07 | 1,73 | 1,04 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 61,46 | 1,74 | 2,83 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 272,07 | 1,37 | 0,50 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 189,81 | 0,69 | 0,36 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 238,06 | 2,06 | 0,87 |
| | English Breakfast | PC2 | 302,83 | 1,03 | 0,34 |
| | Earl Grey | PC3 | 481,39 | 1,68 | 0,35 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 352,31 | 2,04 | 0,58 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 339,05 | 1,02 | 0,30 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 277,16 | 1,03 | 0,37 |

Anexo V – Determinação do poder redutor férrico (FRAP)

Tabela A. 29 Médias, desvios-padrão e coeficientes de variação do poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 5 minutos de chás verdes, chás pretos chás vermelhos e tisanas analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|-------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 164,996 | 0,669 | 0,405 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 245,943 | 7,722 | 3,140 |
| | Gorreana-Hyson | VA3 | 326,277 | 3,974 | 1,218 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 495,133 | 22,194 | 4,482 |
| | Verde Tley | VC2 | 470,430 | 7,809 | 1,660 |
| | Verde Saludem | VC3 | 526,811 | 13,563 | 2,575 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 534,235 | 0,860 | 0,161 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 509,884 | 2,946 | 0,578 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 72,996 | 1,223 | 1,675 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 73,756 | 2,755 | 3,735 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 49,409 | 0,218 | 0,442 |
| | Gorreana-Moinha | PA4 | 131,423 | 3,555 | 2,705 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 32,850 | 0,071 | 0,215 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 83,900 | 0,990 | 1,180 |
| | English Breakfast | PC2 | 314,646 | 3,441 | 1,094 |
| | Earl Grey | PC3 | 572,700 | 5,940 | 1,037 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 291,227 | 5,592 | 1,920 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 352,775 | 4,629 | 1,312 |
| | Preto+Canela+ Laranja-Tley | PC6 | 157,717 | 5,343 | 3,388 |
| Chás vermelho | Red Tea - Lipton | V1 | 231,075 | 11,783 | 5,099 |
| | Rooibos - Diese | V2 | 131,394 | 9,679 | 7,366 |
| | Rooibos Orange - Tetley | V3 | 130,689 | 3,288 | 2,516 |
| | Vermelho - Erva Pura | V4 | 19,400 | 0,566 | 2,916 |
| Tisanas | Tilia - Tetley | T1 | 77,795 | 1,644 | 2,113 |
| | Melissa – Cidreira - Tetley | T2 | 293,859 | 3,787 | 1,289 |
| | Menta - Tetley | T3 | 251,080 | 3,011 | 1,199 |
| | Morroco - Menta - Lipton | T4 | 76,633 | 0,822 | 1,073 |
| | Camomila - Tley | T5 | 172,159 | 0,842 | 0,489 |
| | Verbena - Lúcia-Lima - Lipton | T6 | 165,564 | 1,644 | 0,993 |

Tabela A. 30 Médias, desvios-padrão e coeficientes de poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 15 minutos de chás verdes e chás pretos analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 201,43 | 0,80 | 0,40 |
| | Gorreana-Folha enrolada-Moída | VA1.1 | 407,02 | 3,02 | 0,74 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 120,64 | 1,24 | 1,03 |
| | Gorreana-Encosta de bruma-Moída | VA2.1 | 279,29 | 2,19 | 0,78 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 210,00 | 2,18 | 1,04 |
| | Gorreana-Hysson-Moída | VA3.1 | 514,48 | 0,42 | 0,08 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 373,30 | 0,36 | 0,10 |
| | Verde Tley | VC2 | 375,35 | 1,81 | 0,48 |
| | Verde Saludem | VC3 | 442,47 | 2,36 | 0,53 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 312,58 | 1,21 | 0,39 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 497,54 | 2,28 | 0,46 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 11,82 | 0,06 | 0,53 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 32,79 | 0,30 | 0,92 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 37,85 | 0,21 | 0,57 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 12,54 | 0,19 | 1,54 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 37,40 | 0,43 | 1,14 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 133,55 | 0,79 | 0,59 |
| | English Breakfast | PC2 | 158,88 | 1,08 | 0,68 |
| | Earl Grey | PC3 | 233,48 | 1,31 | 0,56 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 91,83 | 0,49 | 0,54 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 413,86 | 1,74 | 0,42 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 12,96 | 0,26 | 2,02 |

Tabela A. 31 Médias, desvios-padrão e coeficientes de poder redutor férrico (FRAP) de infusões de 30 minutos de chás verdes e chás pretos analisados

| Marca | Variedade | Código | Equival Ác Gálico (mg/L infusão) | | |
|----------------------------|---------------------------------|--------|----------------------------------|---------------|---------------------|
| | | | Média | Desvio Padrão | Desvio relativo (%) |
| Verde Açores | Gorreana-Folha enrolada | VA1 | 393,04 | 1,20 | 0,31 |
| | Gorreana-Folha enrolada-Moída | VA1.1 | 586,11 | 3,62 | 0,62 |
| | Gorreana-Encosta de bruma | VA2 | 319,93 | 1,45 | 0,45 |
| | Gorreana-Encosta de bruma-Moída | VA2.1 | 444,70 | 2,37 | 0,53 |
| | Gorreana-Hysson | VA3 | 414,88 | 2,06 | 0,50 |
| | Gorreana-Hysson-Moída | VA3.1 | 627,47 | 2,34 | 0,37 |
| Verde comercial | Verde Tetley | VC1 | 369,85 | 1,56 | 0,42 |
| | Verde Tley | VC2 | 456,05 | 1,30 | 0,28 |
| | Verde Saludem | VC3 | 501,06 | 0,45 | 0,09 |
| Verde comercial adicionado | Verde+Gins Saludem | VC4 | 65,17 | 0,83 | 1,27 |
| | Verde+Menta Lipton | VC5 | 520,12 | 3,69 | 0,71 |
| Preto Açores | Gorreana-Orange Pekoe | PA1 | 42,60 | 0,95 | 2,22 |
| | Gorreana-Pekoe | PA2 | 15,81 | 0,09 | 0,54 |
| | Gorreana-Broken Leaf | PA3 | 23,71 | 0,09 | 0,36 |
| | Gorreana-Moínha | PA4 | 34,66 | 0,25 | 0,71 |
| | Porto Formoso - Pekoe | PA5 | 14,56 | 0,17 | 1,14 |
| Preto comercial | Li Cungo | PC1 | 79,98 | 0,92 | 1,14 |
| | English Breakfast | PC2 | 138,19 | 1,20 | 0,87 |
| | Earl Grey | PC3 | 214,17 | 0,59 | 0,28 |
| | Preto - Tetley | PC4 | 60,91 | 0,96 | 1,58 |
| Preto comercial adicionado | Preto+Limão-Lipton | PC5 | 79,85 | 1,10 | 1,37 |
| | Preto+Canela+Laranja-Tley | PC6 | 3,86 | 0,10 | 2,62 |

Anexo VI – Compostos individuais identificados nos chás verdes e pretos analisados

Tabela A. 32 Concentração média dos teores de compostos individuais identificados nos chás verdes, expresso em mg/L.

| | Infusões 15 minutos - Chás verdes | Picos | Média dos chás | Média do composto Chás Açores | Média do composto Chás Comerciais | Média do composto Chás Comerciais Adicionados |
|---------------|---|--------------|-----------------------|--------------------------------------|--|--|
| 280 nm | Acido gálico | A1 | 8,07 | 8,35 | 6,48 | 10,03 |
| | ácido 5-galoilquinico | A2 | 16,91 | 13,07 | 15,65 | 24,57 |
| | teobromina | A3 | 6,00 | 3,18 | 6,37 | 9,65 |
| | Galocatequina | A4 | 26,61 | 28,54 | 22,46 | 29,92 |
| | Epigalocatequina | A5 | 8,67 | 9,79 | 7,24 | 9,13 |
| | isómero da galocatequina 1 | A6 | 38,69 | 29,63 | 44,95 | 42,90 |
| | Cafeína + Composto fenólico desconhecido | A7 | 160,42 | 136,20 | 176,35 | 172,85 |
| | epicatequina | A8 | 51,35 | 51,24 | 52,44 | 49,89 |
| | EGCG + Isómero Ác. Cumárico | A9 | 267,26 | 160,21 | 334,73 | 326,63 |
| | Galocatequina-3-galato | A10 | 4,89 | 2,87 | 5,77 | 6,61 |
| | Composto Desconhecido (catequina) | A11 | 20,85 | 30,59 | 14,43 | 15,87 |
| | Epicatequina-3.galato | A12 | 54,00 | 47,95 | 54,38 | 62,49 |
| 320 nm | Ácido Hidroxicinâmico | B1 | 0,86 | 1,00 | 0,38 | 1,38 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | B2 | 0,58 | 0,81 | 0,52 | 0,33 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | B3 | 1,45 | 1,44 | 1,66 | 1,15 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Clorogénico + Cafeína | B4 | 4,09 | 4,73 | 2,76 | 5,12 |
| | Ácido Clorogénico | B5 | 5,77 | 6,67 | 2,63 | 9,12 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Derivado Ác. Cumárico | B6 | 0,68 | 0,97 | 0,46 | 0,57 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác. Cumárico | B7 | 1,29 | 0,42 | 2,09 | 1,39 |
| | Flavona Glicosilada (vitexina-2"-O-ramnosídeo) | B8 | 4,43 | 3,51 | 4,58 | 5,59 |
| | Flavona Glicosilada | B9 | 4,65 | 3,47 | 5,49 | 5,14 |
| | Flavona Glicosilada | B10 | 5,16 | 3,63 | 6,19 | 5,90 |
| | Flavona Glicosilada - derivado do Campferol | B11 | 6,04 | 2,61 | 9,35 | 6,22 |
| | Flavona Glicosilada - derivado do Campferol | B12 | 2,34 | 1,88 | 1,88 | 3,71 |

Continuação da Tabela A.32

| | Infusões 15 minutos - Chás verdes | Picos | Média dos chás | Média do composto Chás Açores | Média do composto Chás Comerciais | Média do composto Chás Comerciais Adicionados |
|---------------|--|-------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|
| 320 nm | Ácido Hidroxicinâmico - Derivado Ác. Clorogénico | B13 | 3,92 | 1,77 | 1,77 | 10,37 |
| | Ácido Hidroxicinâmico | B14 | 0,13 | 0,00 | 0,00 | 0,53 |
| | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | B15 | 3,89 | 4,49 | 3,85 | 3,03 |
| | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | B16 | 3,26 | 3,93 | 2,84 | 2,88 |
| | Flavonol Glicosilado Acilado - derivado do Campferol | B17 | 3,11 | 4,10 | 2,37 | 2,73 |
| 360 nm | Flavonol Glicosilado + catequina | C1 | 3,71 | 3,58 | 3,94 | 3,57 |
| | Flavonol Glicosilado | C2 | 5,45 | 5,05 | 5,28 | 6,30 |
| | Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina | C3 | 8,62 | 6,84 | 11,44 | 7,05 |
| | Flavonol Glicosilado - derivado da Quercitina | C4 | 15,84 | 15,03 | 15,42 | 17,69 |
| | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | C5 | 7,82 | 5,71 | 9,40 | 8,63 |
| | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | C6 | 10,41 | 10,11 | 11,32 | 9,51 |
| | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol | C7 | 4,69 | 4,70 | 4,51 | 4,94 |

Tabela A. 33 Concentração média dos teores de compostos individuais identificados nos chás pretos, expresso em mg/L

| | Infusões 15 minutos - Chás pretos | Picos | Média dos chás | Média do composto Chás Açores | Média do composto Chás Comerciais | Média do composto Chás Comerciais Adicionados |
|---------------|--|--------------|-----------------------|--------------------------------------|--|--|
| 280 nm | Ácido hidroxibenzoico | D1 | 0,97 | 1,38 | 0,68 | 0,53 |
| | Ácido Gálico | D2 | 17,88 | 18,35 | 20,81 | 10,84 |
| | ácido 5 - galoilquinico | D3 | 9,75 | 6,18 | 15,75 | 6,69 |
| | teobromina | D4 | 6,10 | 2,61 | 10,73 | 5,59 |
| | teofilina | D5 | 1,91 | 2,27 | 1,54 | 1,75 |
| | Cafeína + Composto fenólico desconhecido | D6 | 141,70 | 131,93 | 170,73 | 108,07 |
| | Composto fenólico desconhecido | D7 | 14,10 | 16,31 | 12,35 | 12,11 |
| | Epicatequina | D8 | 17,78 | 14,86 | 23,15 | 14,31 |
| | EGCG | D9 | 4,21 | 1,61 | 6,25 | 6,68 |
| | Epicatequina-3-galato | D10 | 9,66 | 4,09 | 17,34 | 8,23 |
| | Teoflavina-3-galato | D11 | 2,57 | 1,90 | 4,54 | 0,28 |
| | Cinamaldeído | D12 | | | | |
| | Teoflavina-3'-galato | D13 | 2,00 | 1,34 | 3,61 | 0,44 |
| | Teoflavina-3,3'-digalato | D14 | 2,42 | 1,35 | 4,62 | 0,70 |
| 320 nm | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Clorogénico | E1 | 3,55 | 2,68 | 4,83 | 3,14 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | E2 | 0,48 | 0,50 | 0,57 | 0,22 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | E3 | 2,05 | 2,06 | 2,57 | 1,00 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Clorogénico | E4 | 7,81 | 4,14 | 12,94 | 6,73 |
| | ácido cumárico | E5 | 4,47 | 4,85 | 5,46 | 1,55 |
| | Flavona Glicosilada | E6 | 3,97 | 3,25 | 5,20 | 3,32 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | E7 | 0,35 | 0,17 | 0,69 | 0,12 |
| | Ácido Hidroxicinâmico - Isómero Ác Cumárico | E8 | 0,46 | 0,48 | 0,58 | 0,18 |
| | Flavona Glicosilada | E9 | 3,34 | 3,20 | 3,81 | 2,75 |
| | Flavona Glicosilada | E10 | 3,37 | 3,25 | 3,79 | 2,82 |
| | Flavonol Glicosilado - derivado do Campferol) | E11 | 2,48 | 2,20 | 2,98 | 2,18 |

Continuação da Tabela A.32

| | Infusões 15 minutos - Chás pretos | Picos | Média dos chás | Média do composto Chás Açores | Média do composto Chás Comerciais | Média do composto Chás Comerciais Adicionados |
|---------------|--|-------|----------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|
| 320 nm | Campferol Glicosilado | E12 | 8,74 | 9,25 | 9,49 | 5,97 |
| | Flavonol Acilado Glicosilado | E13 | 3,71 | 3,76 | 3,59 | 3,84 |
| | Flavonol Acilado Glicosilado | E14 | 3,86 | 3,31 | 4,78 | 3,40 |
| | Flavonol Acilado Glicosilado | E15 | 3,18 | 3,39 | 3,12 | 2,78 |
| | Flavonol Acilado Glicosilado | E16 | 11,99 | 2,54 | 2,49 | 54,61 |
| 360 nm | quercetina glicosilada | F1 | 2,72 | 2,04 | 2,63 | 3,50 |
| | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | F2 | 3,46 | 3,70 | 4,06 | 2,62 |
| | quercetina glicosilada | F3 | 4,56 | 5,91 | 4,35 | 3,43 |
| | Campferol glicosilado | F4 | 3,12 | 3,75 | 3,12 | 2,49 |
| | Isoquercitrina (flavonol glicosilado - derivado da quercetina) | F5 | 8,94 | 16,46 | 7,91 | 2,46 |
| | flavonol glicosilado - miricetina glicosilada | F6 | 7,87 | 3,58 | 11,65 | 8,37 |
| | flavonol glicosilado - miricetina glicosilada | F7 | 5,29 | 4,62 | 7,09 | 4,17 |
| | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | F8 | 7,03 | 5,95 | 8,78 | 6,35 |
| | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | F9 | 2,68 | 2,80 | 3,37 | 1,88 |
| | flavonol glicosilado - derivado do Campferol | F10 | 8,83 | 10,01 | 10,14 | 6,35 |
| | Campferol glicosilado | F11 | 5,29 | 4,46 | 7,08 | 4,34 |